

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17286

人工湿地基质氧化还原酶与净水效果的相关性

余家辉¹, 李冰^{1,2}, 王林¹, 朱加宾¹, 朱健^{1,2}

1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081

摘要: 为研究氧化还原酶活性对人工湿地中污染物去除率的影响, 探讨将基质酶活性作为评判人工湿地整体去除效能的指标, 本研究以生物陶粒和鹅卵石为基质并搭配种植再力花(*Thalia dealbata*)、美人蕉(*Canna indica*)和梭鱼草(*Pontederia cordata*)的复合垂直流人工湿地为研究对象, 2016年6月至11月每月采样1次, 对基质中4种氧化还原酶(脱氢酶、多酚氧化酶、过氧化物酶和硝酸还原酶)的酶活性进行测定, 并从酶学的角度探讨这4种氧化还原酶的活性与养殖尾水中总氮(TN)、硝态氮(NO_3^- -N)、总磷(TP)、正磷酸盐(PO_4^{3-} -P)、 COD_{Mn} 去除率之间的关系。结果表明, 氧化还原酶活性在整个实验过程中发生了显著变化, 脱氢酶和过氧化物酶活性先上升后下降, 酶活性分别在植物生长高峰期的8月和9月达到最高; 多酚氧化酶和硝酸还原酶活性夏季(6—8月)变化不大, 植物生长末期达到最高。空间分布上, 脱氢酶、多酚氧化酶和过氧化物酶活性沿垂直方向分布表现出相同趋势, 即表层最高, 中层次之, 底层最低。硝酸还原酶活性则表现出相反的趋势。脱氢酶活性与 COD_{Mn} 的去除率显著正相关($R^2=0.6783$, $P<0.05$); 硝酸还原酶活性与 NO_3^- -N的去除率显著正相关($R^2=0.6768$, $P<0.05$); 多酚氧化酶和过氧化物酶活性与TN、 NO_3^- -N、TP、 PO_4^{3-} -P以及 COD_{Mn} 的去除率无显著相关性($P>0.05$)。结论认为, 脱氢酶可作为人工湿地中去除 COD_{Mn} 的效能指标, 硝酸还原酶可作为人工湿地中去除 NO_3^- -N的效能指标。

关键词: 人工湿地; 氧化还原酶; 时空分布; 酶活性; 水体净化; 相关性

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)03-0682-12

水产养殖业为人类提供了大量优质蛋白, 但是水产养殖业可持续发展也面临着一系列问题。中国作为水产大国, 水产养殖过程中养殖废水随意排放及养殖用水水质持续恶化成为了目前面临的严重问题。而这两种情况的交替发生, 则形成了一个恶性循环, 不但使水产养殖业成为水污染的一个重要诱因, 而且使水产养殖业作业区域水源恶化加重, 甚至使得行业可利用水资源走向枯竭。因此, 从源头上对养殖水体进行净化并控制其直接排放, 对于维护水域生态环境、保障水产品质量安全、促进渔业经济发展具有重要意义。

人工湿地是指人工建造的、可控制的和工程

化的湿地系统, 其设计和建造是通过湿地生态系统中的物理、化学和生物作用等优化组合来进行污水处理^[1-3]。人工湿地技术作为水产养殖废水处理技术应用起步较晚, 与其他污染物去除技术相比较, 人工湿地技术具有占地面积小、运行周期长、可控性强、寿命长、维护相对简单、去除效果好以及具有良好的景观效果等特点, 是一种长期稳效的水处理技术, 符合生态、高效、可持续发展的理念^[4-7]。

复合垂直流人工湿地-池塘循环水养殖系统作为人工湿地技术, 将水源存储及利用与养殖废水净化回收利用相结合, 形成一种除引水外封闭

收稿日期: 2017-08-04; 修订日期: 2017-09-19.

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-45); 国家科技支撑计划项目(2012BAD25B07); 无锡市农业科技支撑计划项目(CLE02N1510).

作者简介: 余家辉(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产生态养殖. E-mail: 425667529@qq.com

通信作者: 朱健, 研究员, 研究方向为水产健康养殖. E-mail: zhuj@ffrc.cn

的内循环式水资源利用方式。它充分利用滤水性基质、水生植物以及依附于基质和根系表面的微生物种群构建了一种复合型的生态系统,该系统利用物理作用(吸附、过滤和沉淀)、化学作用(离子交换作用)和生物作用(植物和微生物吸收尾水中的营养物质以及微生物新陈代谢等)的协同作用完成净化养殖水体的目的,同时通过养殖尾水中氮、磷等有机物的循环,促进湿地植物和微生物的新陈代谢,从而增加人工湿地循环水养殖系统的稳定性,最终实现养殖尾水的净化和再利用。基质作为该系统中不可或缺的一部分,主要通过物理吸附、沉淀以及内部的酶促反应去除养殖水体中的污染物^[8]。基质酶在人工湿地水体净化过程中,不仅可以加快湿地有机物转化为无机物的速率,还能够把相对分子量高的有机化合物转化为植物和微生物能够直接利用的小分子有机化合物。构建以基质酶活性作为评判人工湿地净化效果的模式体系,正成为人工湿地研究的热点。基质酶中,脲酶和磷酸酶能促进养殖尾水中有机污染物的水解^[9-10];氧化还原酶通过加速基质中氧化还原反应,影响人工湿地内部的腐殖质的形成和有机物的转化^[11]。目前,脲酶和磷酸酶对人工湿地水体净化的影响已有较完善的研究,本实验构建了目前广泛应用的复合垂直流人工湿地(integrated vertical-flow constructed wetland, IVCW),主要分析基质中氧化还原酶活性在人工湿地运行周期内的变化情况,并研究氧化还原酶活性对养殖水体污染物去除率的影响,为进一步阐明基质酶对水体净化的作用,建立快速高效以基质酶活性作为评判人工湿地污染物去除效果的模式体系提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 湿地结构

本次实验的复合垂直流人工湿地-池塘循环水养殖系统于 2012 年 7 月开建,2013 年 5 月建成开始试运行,位于中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴大浦科学实验基地内。人工湿地占地面积为 450 m²(长 30 m,宽 15 m),由沉淀池、调节池、上行池(upflow chamber, UC)、下行池

(downflow chamber, DC)、生物预警池 5 部分组成。上行池和下行池高 70 cm,基质分两层,由上而下分别为直径 2~4 cm 的生物陶粒(上海松承环保科技有限公司生产,型号 SC-TL)和直径 6~10 cm 的鹅卵石,其中上行池陶粒层高 50 cm,鹅卵石层高 10 cm,下行池陶粒层高 40 cm,鹅卵石层高 10 cm,孔隙度 0.55。选定的湿地植物为再力花(*Thalia dealbata*)、美人蕉(*Canna indica*)和梭鱼草(*Pontederia cordata*),植物种植采用单排间作,上行池和下行池中各种种植再力花 90 株、美人蕉 140 株、梭鱼草 140 株,再力花株距 60 cm,美人蕉及梭鱼草株距 40 cm,再力花与美人蕉及梭鱼草间距 40 cm,美人蕉与梭鱼草间距 40 cm,种植时间在 5 月初。养殖池塘水深 1.5 m,占地面积 5 亩(1 亩 = 666.7 m²),以团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)养殖为主,每亩放养团头鲂苗种 3000 尾,配养鲫(*Carassius auratus*)鱼种 400 尾、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)鱼种 60 尾、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)6 尾。

复合垂直流人工湿地-池塘循环水养殖系统从 5 月开始运行,至 11 月结束,水力负荷 278 mm/d,水力停留时间 1.25 d,日处理量 100 m³。处理流程为养殖池塘→沉淀池→调节池→上行垂直潜流湿地→下行垂直潜流湿地→预警池→出水口→养殖池塘。其中沉淀池(长 7.5 m,宽 5 m)中设有配电箱,用于控制两台功率 0.55 kW 的潜水泵(上海喷泉制造厂生产,型号 QS10-10-0.55)进行间歇式进水。且由于水源地及池塘内部浮游动植物非常丰富,为防止湿地堵塞,减轻湿地负荷,延长湿地寿命,在沉淀池和调节池(长 7.5 m,宽 5 m)的隔墙顶部设置过滤网,采用溢流跌水的方式,对残留的漂浮物进行拦截。养殖尾水经由人工湿地上行池和下行池处理过后流入预警池(长 7.5 m,宽 1.5 m),出水速度主要依赖设置在预警池池壁上的阀门进行控制,出水经过预警池和出水口自然曝气和富氧后最终流入养殖池塘。

1.2 湿地样品采集与处理

复合垂直流人工湿地-池塘循环水养殖系统稳定运行一段时间之后,6 月至 11 月每月采样 1 次。样品采集前,先用便携式 pH 仪和溶氧仪测定

进水口、上行池、下行池和出水口的 pH、溶解氧以及温度。然后分别采集基质样品和水体样品。其中基质样品采集于上行池和下行池中, 根据植物的差异, 每种植物两端分别选取 2 个采样点, 上行池和下行池中共 12 个采样点, 于表层(0~10 cm)、中层(15~25 cm)、底层(30~40 cm)分层采集生物陶粒样品。样品采集完毕, 混合同种植物两端的基质样品, 去除杂质后, 带回实验室保存于 4℃ 冰箱中; 水体样品采集于沉淀池、调节池、预警池、出水口、上行池和下行池, 每一个小池采集两个水体样品, 上行池和下行池各采集 4 个水体样品, 其中沉淀池和调节池的 4 个样品作为复合垂直流人工湿地进水口的水体样品, 预警池和出水口的 4 个样品作为复合垂直流人工湿地出水口的水体样品。

1.3 指标测定

基质中脱氢酶的测定采用 TTC(氯化三苯基四氮唑)比色法, 多酚氧化酶和过氧化物酶的测定均采用邻苯三酚比色法, 硝酸还原酶的测定采用酚二磺酸比色法, 所有样品检测前风干、碾碎过 60 目筛。脱氢酶的测定: 取 0.5 g 基质于 50 mL 三角瓶中, 分别加入 2 mL 1% 的 TTC 溶液, 2 mL

蒸馏水, 充分混匀。置于 37℃ 恒温箱中避光培养 24 h。培养结束后, 加入 5 mL 甲醇, 剧烈震荡 1 min 后静置 5 min, 再振荡 20 s, 然后静置 5 min。将三角瓶中的物质全部过滤到比色管中, 并用少量的甲醇洗涤三角瓶 2~3 次, 洗涤液全部过滤到比色管中, 定容至 25 mL, 于 485 nm 下测定吸光度值, 同时设无基质和无 TTC 的对照。脱氢酶活性以 24 h 后 1 g 基质中三苯基甲臜的生成量表示。多酚氧化酶测定: 取 1 g 基质样品, 置于 50 mL 三角瓶中, 然后注入 10 mL 1% 邻苯三酚溶液, 将瓶内含物摇荡后放在 30℃ 恒温箱中培养 2 h。取出后加 4 mL pH 4.5 柠檬酸-磷酸缓冲液, 再加 35 mL 乙醚, 用力摇荡数次, 萃取 30 min。最后, 将含有溶解的紫色没食子素的着色乙醚进行比色。比色时用波长为 430 nm 的滤光片, 每比色一次用无水乙醇洗涤比色液槽一次。过氧化物酶的测定除需在注入 10 mL 1% 邻苯三酚溶液的同时加 2 mL 0.5% 过氧化氢溶液, 其他步骤与多酚氧化酶相同。多酚氧化酶和过氧化物酶活性, 以 2 h 后 1 g 基质紫色没食子素的含量表示。硝酸还原酶的测定: 取 1 g 基质中置于 100 mL 三角瓶中, 加 20 mg 碳酸钙和 1 mL 1% 硝酸钾溶液。仔

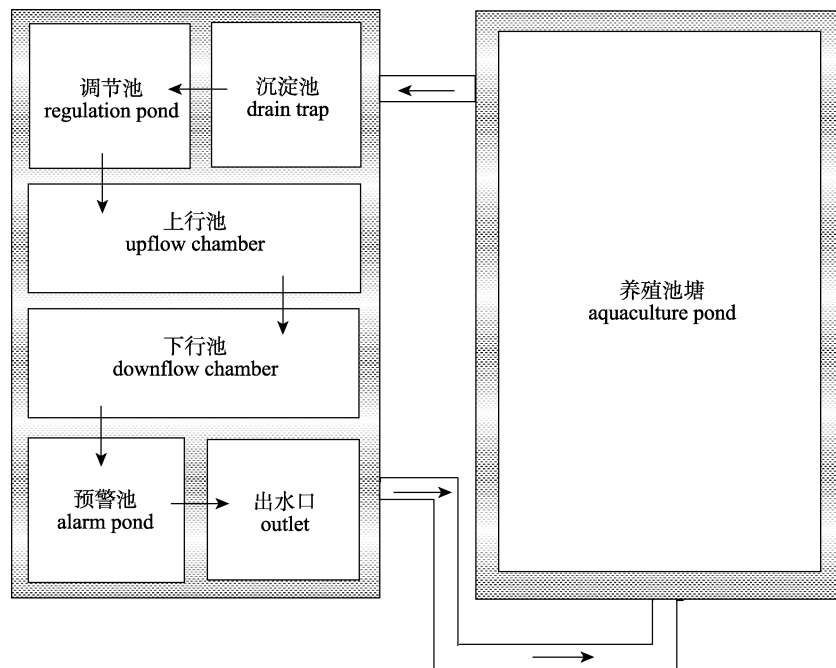


图 1 复合垂直流人工湿地-池塘循环水养殖系统

Fig. 1 Pond recirculating aquaculture system based on the integrated vertical-flow constructed wetland

细混合后,加 1 mL 葡萄糖。将混合液抽气 3 min,稍震荡三角瓶,置于 30℃ 恒温箱中培养 24 h。培养结束后,加 50 mL 水、1 mL 铝钾矾饱和溶液。静置 20 min 后过滤,取 20 mL 滤液移于瓷皿蒸干。加 2 mL 酚二磺酸处理 10 min 后,加 15 mL 蒸馏水,再加 10% 氢氧化钠溶液调 pH 至弱碱性,最后移液至 50 mL 容量瓶中,定容,于波长 450 nm 处比色。硝酸盐还原酶活性以 24 h 后每 10 g 基质中被还原的 NO_3^- -N 微克数表示。具体检测方法以及标准曲线的制作参照《土壤酶及其研究法》^[12]。

水质理化参数中水温(T)和 pH 采用梅特勒-托利多 pH 计现场测定;溶解氧(DO)采用 YSI-550A 型便携式溶氧仪现场测定;总氮(TN)的测定采用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法,硝态氮(NO_3^- -N)测定采用紫外分光光度法,总磷(TP)测定采用过硫酸钾消解-氯化亚锡还原光度法,正磷酸盐(PO_4^{3-} -P)测定采用氯化亚锡还原光度法,高锰酸盐指数(COD_{Mn})测定采用酸性法,具体方法参照《水和废水监测分析方法》^[13]。

1.4 统计方法

实验数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示。采用 SPSS 22.0 软件分别对实验数据在不同采样时间和不同采样深度之间的差异性进行单因素方差分析,并进行 Duncan 多重比较,对不同氧化还原酶活性在上行池和下行池之间的差异性进行独立样本 T 检验,对氧化还原酶活性与污染物去除率相关性采用相关性分析,均以 $P < 0.05$ 作为显著水平。在数据统计分析之前,实验数据要进行正态性和方差齐性检验^[14]。

2 结果与分析

2.1 氧化还原酶活性的时间和空间分布

图 2 为实验过程中氧化还原酶活性的时间和空间分布情况,其中不同层次的酶活性为单月上行池和下行池平均值。从图中可以看出,不同层次脱氢酶的活性随时间分布表现出相同的差异性,6—11 月酶活性先上升后下降,8 月酶活性最高,11 月酶活性最低。表层和中层的多酚氧化酶活性随时间分布表现出相同的差异性,底层酶活性随

时间分布变化不明显。具体表现为,表层和多层多酚氧化酶活性 6—9 月变化不显著且始终处于较低的水平,10 月份开始酶活性显著增加,11 月份酶活性达到最高且与其他月份存在显著差异。底层酶活性,6—10 月变化不显著,11 月酶活性显著增加。过氧化物酶活性表现为植物生长初期(6 月)较低,最高值出现在植物生长的高峰期(9 月),到植物生长末期(11 月)又下降至最低。显著性差异方面,表层酶活性,6 月、8 月和 11 月处于较低水平,7 月和 10 月处于中间水平,9 月处于最高水平。中层酶活性 8 月和 11 月处于较低水平,6 月、7 月和 10 月处于中间水平,9 月处于最高水平但与 7 月不存在显著性差异。底层酶活性,6 月处于最低水平,8 月和 11 月酶活性显著高于 6 月,7 月和 10 月显著高于 11 月但和 8 月不存在显著性差异,9 月酶活性最高且与其他月份存在显著性差异。硝酸还原酶 6—9 月酶活性较低,且无论哪一层均无显著性差异,10 月各层酶活性均显著增加,11 月各层酶活性达到最高。

空间分布上,不同月份的脱氢酶活性表现出相同的差异性,总体而言脱氢酶活性随着基质层深度的增加,亦相对递减,酶活性由高到低依次为表层、中层、底层且各层次之间均存在显著性差异。基质多酚氧化酶活性沿垂直方向整体表现出与脱氢酶活性相同的趋势,即表层最高,中层次之,底层最低,但随时间变化表现出不同的显著差异,具体表现为,6—9 月表层多酚氧化酶活性显著高于中层和底层,但中层和底层之间无显著性差异,10 月和 11 月,各层之间均存在显著性差异。过氧化物酶活性表层最高,中层和底层不同月份之间表现出不同的差异性。具体表现为,6 月酶活性表层 > 中层 > 底层,且各层之间存在显著性差异;7—11 月表层酶活性显著高于中层和底层,但中层和底层之间无显著性差异。硝酸还原酶活性沿垂直方向表现出与其他 3 种酶相反的趋势,基质表层表现出最低的酶活性,且 6—9 月显著低于中层和底层。10 月和 11 月,虽然表层酶活性同样表现出最低的酶活性,但只显著低于底层酶活性,与中层不存在显著性差异。

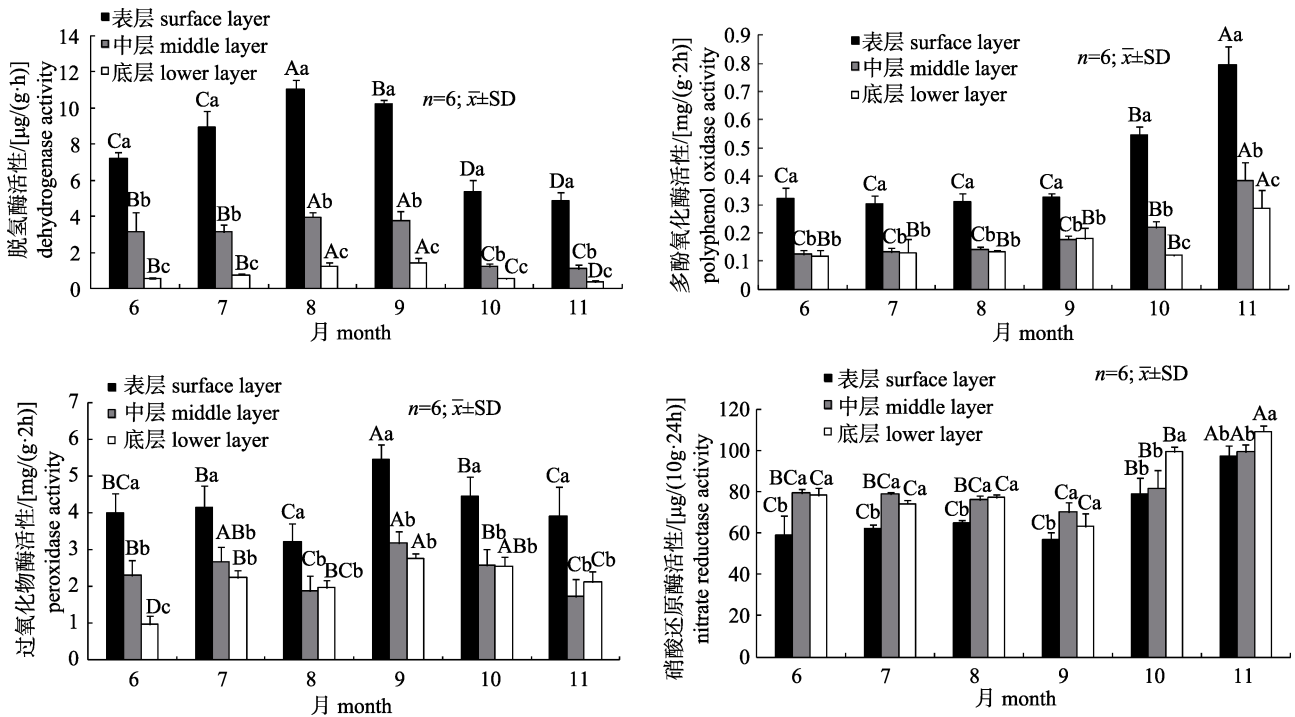


图 2 人工湿地不同时期氧化还原酶活性
不同字母表示差异显著($P < 0.05$), 大写字母表示同一层次不同时期差异性分析,
小写字母表示相同时期不同层次的差异性分析。

Fig. 2 Oxidoreductase activity in different periods in the constructed wetlands
Different letters mean the difference is significant at 0.05 level, different capital letters represent
significant difference among different periods at the same layer, and different lowercase letters represent
significant difference among different layers in the same periods.

表 1 人工湿地上行池和下行池水温、pH 和溶解氧值

Tab. 1 Water temperatures, pH and dissolved oxygen values in upflow chamber and downflow chamber of constructed wetlands
 $n=4; \bar{x}\pm\text{SD}$

月份 month	试验池 test chamber	温度/ $^{\circ}\text{C}$ water temperature	pH	DO/ (mg/L)
6	上行池 UC	25.21 \pm 0.03 ^b	7.52 \pm 0.15 ^a	2.20 \pm 0.60 ^a
	下行池 DC	25.23 \pm 0.04 ^b	7.47 \pm 0.05 ^a	1.88 \pm 0.53 ^a
7	上行池 UC	29.10 \pm 0.02 ^a	7.44 \pm 0.15 ^a	2.13 \pm 0.25 ^a
	下行池 DC	29.56 \pm 0.05 ^a	7.34 \pm 0.05 ^a	1.85 \pm 0.13 ^a
8	上行池 UC	30.12 \pm 0.10 ^a	7.66 \pm 0.05 ^a	2.16 \pm 0.55 ^a
	下行池 DC	30.98 \pm 0.07 ^a	7.59 \pm 0.12 ^a	1.92 \pm 0.42 ^a
9	上行池 UC	24.60 \pm 0.12 ^b	7.10 \pm 0.12 ^a	2.07 \pm 0.25 ^a
	下行池 DC	24.61 \pm 0.20 ^b	7.32 \pm 0.21 ^a	2.48 \pm 0.88 ^a
10	上行池 UC	18.25 \pm 0.20 ^c	6.82 \pm 0.20 ^b	1.87 \pm 0.70 ^a
	下行池 DC	17.98 \pm 0.15 ^c	6.85 \pm 0.03 ^b	1.55 \pm 0.65 ^a
11	上行池 UC	15.56 \pm 0.01 ^c	6.79 \pm 0.21 ^b	1.57 \pm 0.47 ^a
	下行池 DC	15.11 \pm 0.04 ^c	6.80 \pm 0.11 ^b	1.42 \pm 0.28 ^a

注: 同列数据上标不同表示组间存在显著差异($P < 0.05$). UC 表示上行池; DC 表示下行池。

Note: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). UC: upflow chamber; DC: downflow chamber.

2.2 上行池和下行池中氧化还原酶分布情况

从图 3 中可以看出, 无论是上行池还是下行

池, 脱氢酶活性均先上升后下降, 8 月份酶活性最

高, 11 月酶活性最低。整个实验过程中上行池中

表 2 人工湿地进水口水质指标
Tab. 2 Parameters of the integrated vertical-flow constructed wetland influent

月份 month	总氮 TN	硝态氮 NO ₃ -N	总磷 TP	正磷酸盐 PO ₄ ³⁻ -P	高锰酸盐指数 COD _{Mn}
6	3.56±0.12 ^b	0.14±0.02 ^c	0.53±0.07 ^{ab}	0.07±0.02 ^b	9.02±1.08 ^{bcd}
7	3.96±0.32 ^{ab}	0.14±0.01 ^c	0.57±0.07 ^a	0.04±0.01 ^b	8.53±0.58 ^{cd}
8	4.02±0.18 ^a	0.17±0.02 ^b	0.48±0.05 ^{bc}	0.05±0.01 ^b	9.31±1.89 ^{bcd}
9	4.48±0.68 ^a	0.24±0.03 ^a	0.57±0.07 ^a	0.19±0.02 ^a	12.93±1.42 ^a
10	3.01±0.41 ^b	0.18±0.02 ^b	0.45±0.05 ^c	0.21±0.04 ^a	10.39±0.87 ^b
11	2.16±0.31 ^c	0.12±0.01 ^c	0.41±0.04 ^c	0.04±0.01 ^b	7.98±0.94 ^d

注: 同列数据上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Note: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

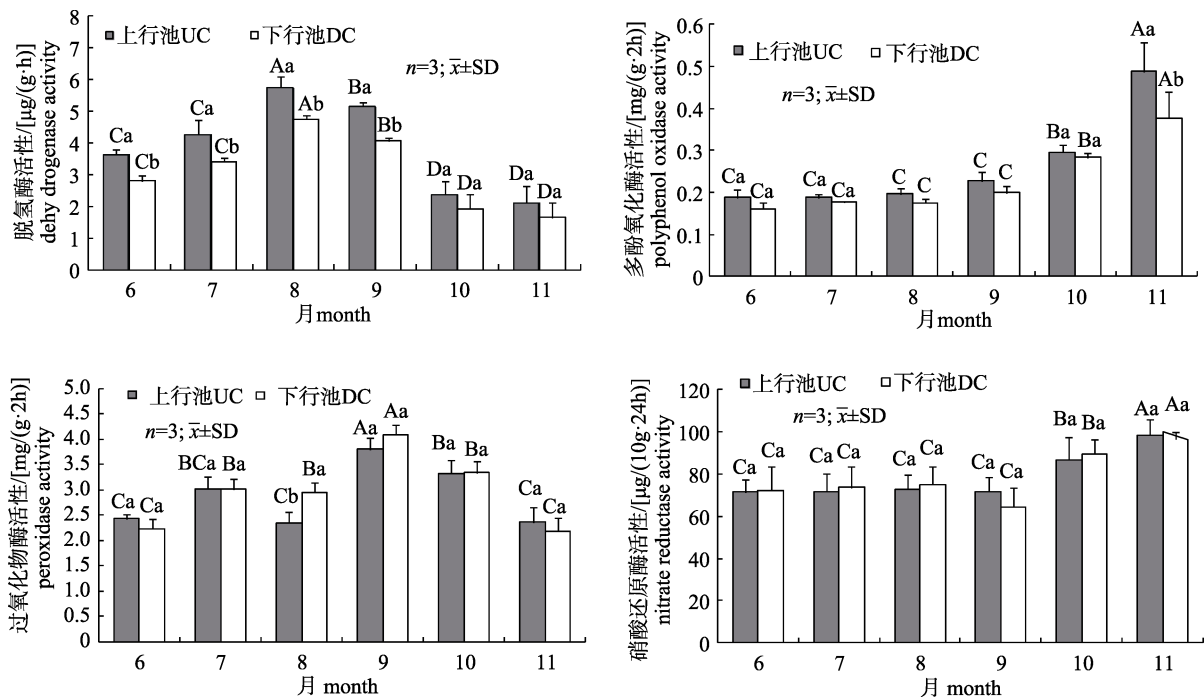


图 3 人工湿地不同时期上行池和下行池中氧化还原酶活性

不同字母表示差异显著($P<0.05$), 大写字母表示上行池或下行池内不同时期差异性分析, 小写字母表示相同时期的差异性分析。

Fig. 3 Oxidoreductase activity in different periods of upflow chamber (UC) and downflow chamber (DC) in constructed wetland. Different letters mean the difference is significant at 0.05 level. Capital letters represent difference analysis in the different periods of the UC and DC, and lowercase letters represent difference analysis in the same period.

脱氢酶的活性均高于下行池, 但 6—9 月酶活性存在显著性差异, 10 月和 11 月无显著性差异($P>0.05$)。6—11 月上行池和下行池中的多酚氧化酶活性均呈现增长的趋势, 6—10 月上行池和下行池的多酚氧化酶无显著性差异($P>0.05$), 11 月上行池酶活性显著高于下行池($P<0.05$)。上行池中过氧化物酶活性 6 月最高, 9 月最低, 下行池中 11 月最低, 9 月最高; 8 月下行池酶活性显著高于上行池, 其他月无差异。整个实验过程中, 硝酸还

原酶活性于上行池和下行池中均无显著差异($P>0.05$), 上行池中酶活性 6 月最低, 11 月最高, 下行池中 9 月最低, 11 月最高。

2.3 人工湿地污染物去除率

由图 4 可知, 人工湿地循环水养殖系统对 TN 去除率为 18.9%~38.4%, NO₃-N 去除率为 55.2%~73.6%, TP 去除率为 28.9%~64.6%, PO₄³⁻-P 去除率为 30.1%~59.0%, COD_{Mn} 去除率为 7.4%~16.3%。上行池中 TN、NO₃-N、TP、PO₄³⁻-P 和 COD_{Mn} 月

平均去除率分别为 16.7%、48.3%、34.9%、30.5% 和 7.6%，占人工湿地污染物总去除率的 64.4%、79.4%、77.1%、71.3% 和 76.2%。这说明养殖水体中污染物的去除主要发生在上行池中，下行池和出水口对 5 种污染物的月平均去除率均处在一个较低的水平。

人工湿地系统中不同月份污染物去除率之间存在差异显著。TN 的去除率总体表现为人工湿地系统运行初期(6—7 月)较低，去除效果最佳的时期出现在湿地稳定运行的中期(8—9 月)，到人工湿地运行末期(10—11 月)TN 去除率又下降至初期的水平；显著性差异方面，湿地中期对 TN 的去除效果显著高于初期和末期。NO₃-N 去除率 6—9 月之间变化不显著且始终处于较低的水平，10

月份 NO₃-N 去除率显著增加，11 月份去除率略有下降但仍显著高于 6—9 月份。人工湿地对 TP 的去除率一直呈下降的趋势，且夏季(6—8 月)去除率显著高于秋季(9—11 月)。PO₄³⁻-P 的去除率前期处于一个较低的水平，8 月份开始去除率显著增加，9 月达到最高且显著高于其他月份，10 月和 11 月的去除率又下降至同 8 月份水平。COD_{Mn} 的去除率总体而言先上升后下降，8 月份去除效果最佳，6 月、7 月和 9 月去除效果一般，10 月和 11 月去除效果最差。

2.4 氧化还原酶活性与污染物去除率的相关性

相关性分析表明，脱氢酶活性与 COD_{Mn}($R^2=0.6783$ 、 $P<0.05$)总去除率之间显著正相关，但与 TN、NO₃-N、TP 和 PO₄³⁻-P 的去除率没有显著相

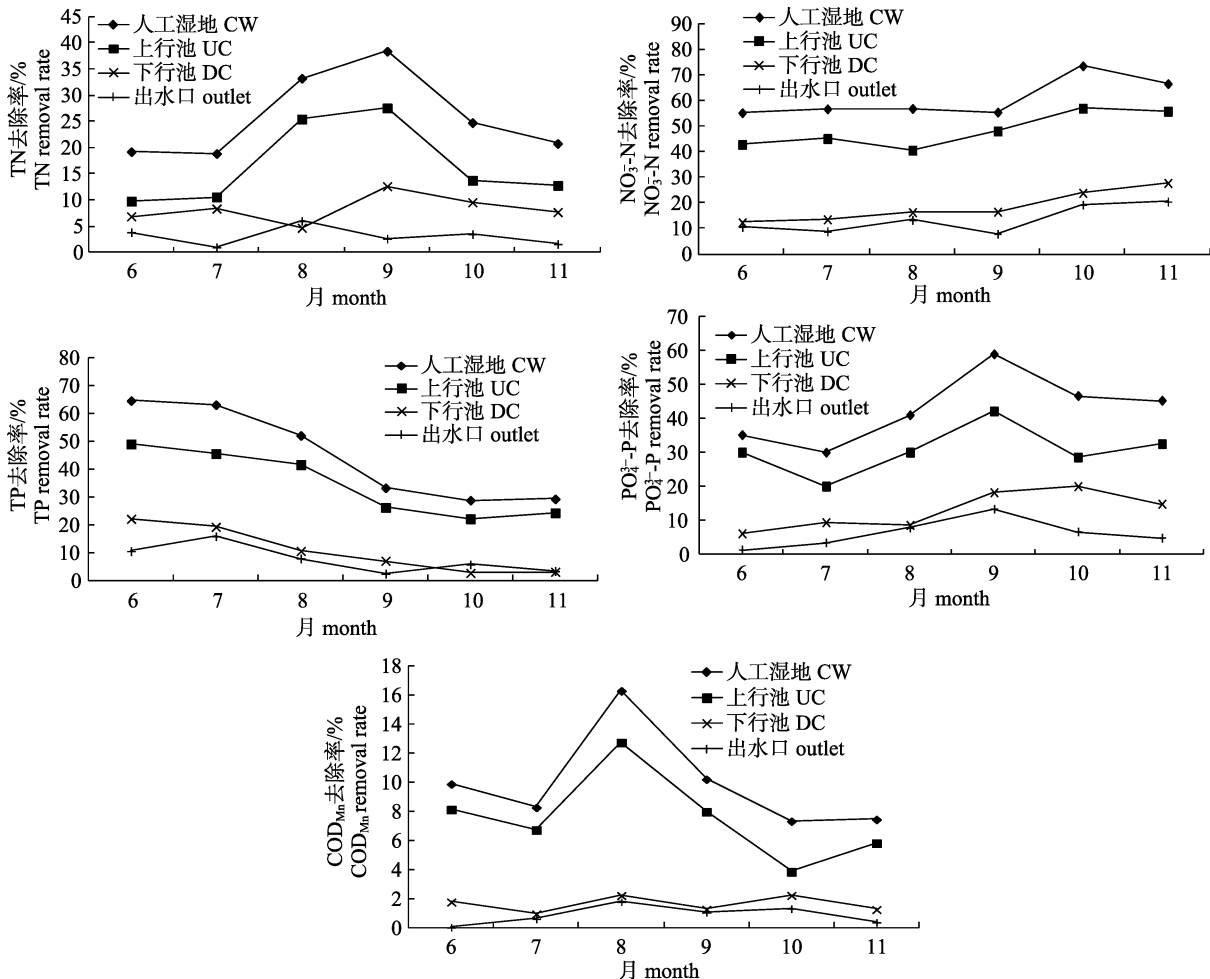


图 4 人工湿地不同时期污染物去除率

CW 表示人工湿地; UC 表示上行池; DC 表示下行池。

Fig. 4 Contaminants removal rate of integrated vertical-flow constructed wetland in different periods
CW: constructed wetland; UC: upflow chamber; DC: downflow chamber.

关性。这说明脱氢酶对 COD_{Mn} 的去除发挥了重要作用, 可以把脱氢酶活性作为判定人工湿地去除养殖水体中 COD_{Mn} 效能的指标。多酚氧化酶和过氧化物酶活性与 TN 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 TP 、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 和 COD_{Mn} 去除率之间无显著相关性, 因此多酚氧化酶和过氧化物酶活性不能作为判断湿地污水效能的

指标。硝酸还原酶活性与 $\text{NO}_3\text{-N}$ ($R^2=0.6768$, $P<0.05$) 去除率显著正相关, 但与 TN 、 TP 、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 和 COD_{Mn} 去除率没有显著相关性。说明硝酸还原酶对养殖水体中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的去除具有促进作用, 基质硝酸还原酶可以作为判断湿地污水效能的一个指标。

表3 氧化还原酶活性与污染物去除率的相关系数

Tab. 3 The correlation coefficients between oxidoreductase activity and contaminants removal rate

氧化还原酶 oxidoreductase	总氮 TN	硝态氮 $\text{NO}_3\text{-N}$	总磷 TP	正磷酸盐 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$	高锰酸盐 COD_{Mn}
脱氢酶 dehydrogenase	0.6592	-0.7743	0.4242	0.0463	0.8236*
多酚氧化酶 polyphenol oxidase	-0.2350	0.7064	-0.7302	0.3000	-0.4971
过氧化物酶 peroxidase	0.6484	-0.0041	-0.3700	0.6226	-0.0879
硝酸还原酶 nitrate reductase	-0.4061	0.8227*	-0.6069	0.0753	-0.4842

注: 表中的数据为氧化还原酶活性和污染物去除率的相关系数; *代表差异显著($P<0.05$)。

Note: The data in the table is the correlation coefficients of oxidoreductase activity and pollutant removal rate. * means the difference is significant at 0.05 level.

3 讨论

3.1 氧化还原酶活性的时间和空间分布特征

氧化还原酶活性的时间分布差异主要受进水中污染物浓度以及湿地环境变化的影响。脱氢酶作为已知酶中种类最多的一类^[15], 酶活性受外界环境变化影响较大。夏季(6—8月)温度较高, 湿地中微生物分泌酶的能力增强, 脱氢酶活性较高; 而在秋季(9—11月), 温度逐渐降低, 微生物代谢能力减弱, 因此脱氢酶活性相应降低。多酚氧化酶具有去甲基化作用, 可以有效地降解木质素, 能够反映基质中的腐殖质情况^[16]。结合图2可见, 多酚氧化酶活性夏季(6—8月)变化不大, 但10月和11月酶活性却急剧增加, 表层增加得尤为明显。主要是因为, 6月份人工湿地刚运行不久, 湿地植物生长旺盛, 枯枝落叶较少, 多酚氧化酶活性较低; 10月份天气开始转冷, 湿地植物的部分老叶枯萎, 腐殖质含量上升, 多酚氧化酶含量也随之上升。11月份植物大面积凋零, 产生了大量的枯枝落叶, 湿地表层腐殖质急剧增加, 多酚氧化酶活性达到最高。过氧化物酶可以氧化基质中的有机质, 促进腐殖质分解^[17], 其酶活性主要受微生物活动和湿地生物量影响。人工湿地系统刚开始运行, 过氧化物酶活性保持在较低的水平,

底层酶活性尤其低, 主要原因可能是人工湿地系统刚运行不久湿地生物量较低, 酶促反应缺少底物。9月份湿地生物量达到最高, 湿地内部代谢水平达到最高, 酶活性达到最高。11月份酶活性再次下降, 可能是由于气温降低, 人工湿地中微生物作用减弱造成的。溶解氧对于反硝化脱氮具有抑制作用^[18], 人工湿地系统去除有机质所需的氧气, 主要来自进水、自然曝气富氧以及植物根系输氧。本实验中, 硝酸还原酶活性6—9月份处于较低水平, 10月份之后酶活性出现较明显的增长。主要原因是, 夏季湿地植物生长茂盛, 向根部供氧能力较强, 抑制了硝酸还原酶的活性, 9月份湿地生物量最高, 输氧能力最强, 酶活性最低; 10月份和11月份温度降低, 湿地植物开始枯萎, 向根系供氧能力减弱, 硝酸还原酶活性增强。

氧化还原酶空间分布差异主要由复合垂直流人工湿地—池塘循环水养殖系统独特的结构、水流方式以及植物根系在不同层次中分布差异造成的^[19]。本实验中植物根系主要分布在深度5~15cm的基质层中, 基质层越深根系分布越少, 因此表层脱氢酶酶活性显著高于中层和底层。而多酚氧化酶的酶活性, 主要受湿地中的腐殖质情况影响。整个实验过程中腐殖质主要存在于湿地表面, 因此表层表现出最高的酶活性。6—8月中层和底

层酶活性无显著差异而 10 月和 11 月中层和底层存在显著性差异,可能是因为 10 月之后湿地植物开始大面积凋零,湿地表层的一部分的腐殖质被水流冲到了中层,导致中层酶活性显著大于底层。过氧化物酶活性 7—11 月中层和底层无显著性差异,而 6 月中层酶活性显著高于底层,主要原因可能是 6 月人工湿地系统刚运行不久,湿地生物量较低,酶促反应缺少底物,且由于植物种植不久,根系不发达,湿地底部能进行反应的底物尤其少,因此,底层酶活性显著低于中层。硝酸还原酶活性受水体中溶解氧浓度影响较大,基质表层表现出最低的酶活性,主要是因为溶解氧对于反硝化脱氮具有抑制作用。基质中层和底层因为好氧微生物的活动以及根系分布不发达,相较于表层而言氧气浓度较低,反硝化作用受到的抑制较弱。6—9 月份湿地生物量较高,植物输氧能力较强,抑制了表层的反硝化作用,导致表层酶活性显著低于中层和底层。10 月和 11 月生物量降低,植物输氧能力减弱,表层和中层表现出相同的差异性。

3.2 氧化还原酶活性在上行池和下行池中的分布特征

研究表明人工湿地中脱氢酶活性与进水中污染物的浓度成正比^[20],整个实验过程中上行池脱氢酶活性始终大于下行池,这是因为人工湿地运行过程中,养殖水体先流经上行池,这就造成了下行池进水口污染物浓度比上行池进水口污染物浓度低,从而导致上行池和下行池中酶活性差异。6—9 月上行池中的脱氢酶活性显著高于下行池,而 10 月和 11 月并无显著差异,这主要是因为 10 月开始温度下降,养殖池塘投饵量减少,养殖尾水中的污染物浓度也随之下降,导致上行池和下行池中污染物的浓度相对接近,使得两池中脱氢酶活性差异不显著。6—10 月上行池和下行池中多酚氧化酶活性无显著差异,而 11 月上行池酶活性显著高于下行池,可能是因为上行池水流流向朝上,使得凋零的枯枝落叶多数被水流冲到了基质表层,而下行池由于水流流向朝下,枯枝落叶易被水流冲到中层和底层,而植物根系主要集中在表层,上行池中的枯枝落叶被根系微生物分

解成腐殖质的速度远高于下行池,6—10 月湿地中腐殖质含量相对较少,上行池和下行池中的酶活性并无显著差异,11 月湿地中腐殖质含量达到最高,上行池酶活性显著高于下行池。过氧化物酶活性于上行池和下行池中普遍无显著性差异,只在 8 月份下行池酶活性显著高于上行池,可能是因为采样当天污染物的浓度以及水流情况等不稳定因素造成的。硝酸还原酶活性除 9 月以外其他各月上行池酶活性均低于下行池,但无显著性差异,主要原因可能是人工湿地循环水养殖系统中溶解氧的含量沿水流方向逐渐降低^[21],养殖水体先流经上行池,导致上行池中溶解氧浓度较下行池稍高,所以下行池中硝酸还原酶活性普遍高于上行池。9 月上行池酶活性高于下行池且差异显著。主要的原因可能是,9 月份湿地生物量接近饱和状态,导致上行池中输水管道堵塞,大多数进水不能沿管道两边的开孔进入上行池中,而通过湿地底部的输淤管直接进入下行池,使得上行池得不到进水中氧气的补充,硝酸还原酶活性降低。

3.3 人工湿地中污染物去除特征

复合垂直流人工湿地系统对 TN 去除效果一般,但对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 却具有良好的去除效果。研究表明当进水中 C/N 为 4 时,生物陶粒具有最佳的脱氮效果,而就 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的去除而言,较低的 C/N 下 (C/N=3)也能有很好的去除效果^[22]。本实验进水口的 C/N 始终维持在 3 左右,这就造成了 $\text{NO}_3\text{-N}$ 具有良好的去除效果,而 TN 的去除率却处在一个较低的水平。且从图 5 中可以发现,TN 在上行池的去除率只占总去除率的 64.4%,而其他 4 种污染物在上行池中的去除率占总去除率的比例均在 70%以上,这很可能是因为养殖水体流经上行池的过程中,含 C 有机物的去除率较低,而 TN 的去除率相对较高,使得养殖水体流入下行池后,C/N 显著增加,导致 TN 去除率于下行池中所占的比重明显高于其他 4 种污染物。这也从侧面证明了本实验中提高 C/N 对脱氮具有促进作用。人工湿地中磷的去除主要依靠陶粒的吸附和络合作用^[23]。由于湿地中陶粒的数量和表面积是一定的,当人工湿地—循环水养殖系统长时间的运行后,生物陶粒对磷的吸附相对面积会越来越小,从而导致

TP 的去除率越来越低, 这就合理解释了 TP 去除率变化的原因。而水体中 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的去除, 除了生物陶粒的吸附之外, 植物和微生物的吸收也具有很大的作用, 6—8 月 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的去除率逐渐上升, 这应该是基质吸附以及植物和微生物吸收共同作用的结果, 而 9 月之后, 温度开始下降, 植物和微生物对 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的吸收能力开始减弱, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的去除率也随之下降。 COD_{Mn} 的去除率先上升后下降, 9 月份达到最高, 主要原因可能是 6—8 月温度较高, 植物和微生物作用较强, 基质酶活性较高, COD_{Mn} 去除率相对较高。9 月份之后温度开始下降, 微生物活动开始减弱, COD_{Mn} 去除率也相应下降。

3.4 氧化还原酶活性与养殖水体污染物的相关性比较分析

本实验中, 脱氢酶活性只与 COD_{Mn} 的去除率显著相关, 主要原因可能是: 养殖水体中 TN 和 TP 占总有机污染物的比例相对较低。从测定的数据看, 进水中 TN 的浓度范围 2.16~4.81 mg/L, TP 浓度范围 0.41~0.57 mg/L, 而 COD_{Mn} 最小浓度为 7.98 mg/L, 最大浓度则达到 12.93 mg/L。人工湿地系统对含 N 污染物的去除主要依靠微生物作用和植物的吸收^[24-25]。微生物反硝化作用的脱氮量能够占到人工湿地系统总去氮量的 80%左右^[26-27]。反硝化脱氮过程中, 反硝化细菌通过利用硝酸还原酶、亚硝酸还原酶等还原酶控制反硝化作用^[28]。硝酸还原酶催化 $\text{NO}_3\text{-N}$ 还原生成 $\text{NO}_2\text{-N}$ 作为反硝化过程中的第一步, 其酶活性与 $\text{NO}_3\text{-N}$ 去除率具有直接关系。硝酸还原酶的活性与 $\text{NO}_3\text{-N}$ 去除率显著相关, 但与 TN 去除率无显著相关性, 可能是因为在养殖水体中无机氮占 TN 的比例相对较低。测定的数据也证明了这一观点, 进水中 TN 的浓度范围为 2.16~4.81 mg/L, 而进水中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度范围分别只有 0.38~1.43 mg/L、0.12~0.24 mg/L 和 0.03~0.08 mg/L, 进水中无机氮浓度大约只占 TN 浓度的 32.7%。总体而言, 脱氢酶和硝酸还原酶与养殖水体净化效果具有明显的正相关性, 脱氢酶活性可作为判定人工湿地去除养殖水体中 COD_{Mn} 效能的指标; 硝酸还原酶活性可作为判定人工湿地去除养殖水体中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 效能的指标。

参考文献:

- [1] Zhang Q. Construction and application of constructed wetlands[J]. *Wetland Science*, 2011, 9(4): 373-379. [张清. 人工湿地的构建与应用[J]. *湿地科学*, 2011, 9(4): 373-379.]
- [2] Xia H P. Mechanisms and efficiencies on wastewater treatment with constructed wetlands[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2002, 21(4): 52-59. [夏汉平. 人工湿地处理污水的机理与效率[J]. *生态学杂志*, 2002, 21(4): 52-59.]
- [3] Chen Z W, Song L Y. The status and trends of wetland research in China[J]. *Energy and Environment*, 2015(1): 15-16. [陈振伟, 宋良友. 中国湿地研究现状及发展趋势[J]. *能源与环境*, 2015(1): 15-16.]
- [4] Vymazal J. Constructed wetlands for wastewater treatment: five decades of experience[J]. *Environment Science and Technology*, 2011, 45: 61-69.
- [5] Kadlec R, Knight R, Vymazal J, et al. Constructed wetlands for pollution control: processes, performance, design and operation[J]. *Scientific and Technical Report*, 2000, 8: 110-112.
- [6] Kivaisi A K. The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review[J]. *Ecological Engineering*, 2001, 16(4): 545-560.
- [7] Vymazal J. The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater[J]. *Ecological Engineering*, 2009, 35(1): 1-17.
- [8] Wei C, Liu P, Qin J. Effects of substrate sand plants on purification efficiency of constructed wetland[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(8): 3691-3697. [魏成, 刘平, 秦晶. 不同基质和不同植物对人工湿地净化效率的影响[J]. *生态学报*, 2008, 28(8): 3691-3697.]
- [9] Liang W, Wu Z W. Relationship between the phosphatase and urease activities in plant root-zone and purification of wastewater in the integrated vertical constructed wetland[J]. *Plant Physiology Communications*, 2002, 38(6): 545-548. [梁威, 吴振武. 复合垂直流构建湿地植物根区磷酸酶及脲酶活性与污水净化的关系[J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(6): 545-548.]
- [10] Wu S L, Liu H, Cui L H. The enzyme activities and its correlation with the purification of pollutants in integrated constructed wetland[J]. *Environmental Engineering*, 2015, 33(1): 15-18. [吴属连, 刘欢, 崔理华. 复合人工湿地系统酶活性及其与污染物净化效果的相关性[J]. *环境工程*, 2015, 33(1): 15-18.]
- [11] Pemeci P, Casueci C, Dumontet S. An improved method to evaluate the o-diphenol oxidase activity of soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(13): 1927-1933.
- [12] Guan S Y. *Soil Enzyme and Its Research Method*[M]. Bei-

- jing: Agricultural Press, 1986: 320-338. [关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 320-338.]
- [13] The State Environmental Protection Administration. Water and Wastewater Monitoring Analysis Method[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 223-266. [国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 223-266.]
- [14] Zar J H. Biostatistical Analysis[M]. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999: 389-394.
- [15] Jing Y M, Zhang J, Zhang C L, et al. Study on correlation between dehydrogenase activity and pollutant removal in constructed wetland[J]. Environmental Engineering, 2008, 26(5): 95-96. [靖玉明, 张建, 张成禄, 等. 人工湿地中脱氢酶活性及其与污染物去除之间的相关性研究[J]. 环境工程, 2008, 26(5): 95-96.]
- [16] Hao J C, Wu Y Y, Lian B, et al. Properties of polyphenol oxidase in soil and its significance[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2006, 37(3): 470-474. [郝建朝, 吴沿友, 连宾, 等. 土壤多酚氧化酶性质研究及意义[J]. 土壤通报, 2006, 37(3): 470-474.]
- [17] Tan B, Wu F Z, Yang W Q, et al. Activities of soil oxidoreductase and their response to seasonal freeze-thaw in the subalpine/alpine forests of western Sichuan[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(21): 6670-6678. [谭波, 吴福忠, 杨万勤, 等. 川西亚高山/高山森林土壤氧化还原酶活性及其对季节性冻融的响应[J]. 生态学报, 2012, 32(21): 6670-6678.]
- [18] Wang W L, Han R M, Wang G X, et al. Research advancements on the radial oxygen loss in wetland plants and its diffusion effect in natural sediments[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(22): 7286-7297. [王文林, 韩睿明, 王国祥, 等. 湿地植物根系泌氧及其在自然基质中的扩散效应研究进展[J]. 生态学报, 2015, 35(22): 7286-7297.]
- [19] He Q L, Liang W, He F, et al. Activities of substrate oxidoreductase in the integrated vertical flow constructed wetland[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2008, 14(1): 94-98. [何起利, 梁威, 贺锋, 等. 复合垂直流人工湿地基质氧化还原酶活性研究[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(1): 94-98.]
- [20] Zeng M Z. Study on the correlation between the substrate enzyme and its activities and purification of pond aquaculture wastewater in the constructed wetland[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008: 36-38. [曾梦兆. 人工湿地基质酶及其活性与净化养殖废水效果相关性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008: 36-38.]
- [21] Yao Y D, Li G, Tao L, et al. Analysis of microbial community structure in an integrated pond recirculating aquaculture system[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 407-415. [姚延丹, 李谷, 陶玲, 等. 复合池塘循环水养殖系统微生物群落结构分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 407-415.]
- [22] Wu X H, Li Y M. Effect of C/N ratio on denitrification of denitrification filters with different filter materials[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2017, 11(1): 55-62. [吴兴海, 李咏梅. 碳氮比对不同滤料反硝化滤池脱氮效果的影响[J]. 环境工程学报, 2017, 11(1): 55-62.]
- [23] Li A Q, Li W C, Pan J Z, et al. Phosphorus removal efficiency of constructed wetland with difference compound substrates treating pre-treated wastewater[J]. Journal of Lake Sciences, 2006, 18(2): 134-138. [李爱权, 李文朝, 潘继征, 等. 人工湿地复合基质深度净水除磷实验[J]. 湖泊科学, 2006, 18(2): 134-138.]
- [24] Dierberg F E, Debusk T A, Jackson S D, et al. Submerged aquatic vegetation-based treatment wetlands for removing phosphorus from agricultural runoff: response to hydraulic and nutrient loading[J]. Water Research, 2002, 36(6): 1409-1422.
- [25] Verhoeven J T A, Meuleman A F M. Wetlands for wastewater treatment: opportunities and limitations[J]. Ecological Engineering, 1999, 12(1): 5-12.
- [26] Hammer D A. Constructed wetlands for wastewater treatment: municipal, industrial and agricultural[J]. Journal of Environmental Quality, 1989, 19(4): 481-494.
- [27] Bai J H, Ouyang H, Deng W, et al. A review on nitrogen transmission processes in natural wetlands[J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(2): 326-333. [白军红, 欧阳华, 邓伟, 等. 湿地氮素传输过程研究进展[J]. 生态学报, 2005, 25(2): 326-333.]
- [28] Li W F, Zheng J J, Zhang X P, et al. Progress in studies on denitrification enzymes and environmental impact factors[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(1): 166-170. [李卫芬, 郑佳佳, 张小平, 等. 反硝化酶及其环境影响因子的研究进展[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 166-170.]

Correlation between substrate oxidoreductase and water purification in constructed wetlands

YU Jiahui¹, LI Bing^{1,2}, WANG Lin¹, ZHU Jiabin¹, ZHU Jian^{1,2}

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: The present study sampled every month from June to November in 2016, aimed to assess the effect of oxidoreductase activity on the removal rate of pollutants from constructed wetlands and to determine whether matrix enzyme activity can be used to assess the effectiveness of overall removal rate. Integrated vertical-flow constructed wetlands that incorporated two substrates (bio-ceramics and pebbles) and three plant species (*Thalia dealbata*, *Canna indica*, and *Pontederia cordata*) were constructed to investigate the activity of four oxidoreductases (dehydrogenase, polyphenol oxidase, peroxidase, and nitrate reductase) and to explore the relationship between enzyme activity and removal rates of total nitrogen (TN), nitrate nitrogen (NO_3^- -N), total phosphorus (TP), orthophosphate (PO_4^{3-} -P), and COD_{Mn} from aquaculture wastewater. Oxidoreductase activities were significantly different in the experimental operation cycle. Dehydrogenase and peroxidase activities initially increased and then decreased, and the enzyme activities reached maximum levels during the peak of plant growth. Polyphenol oxidase and nitrate reductase activities were not significantly different from June to August and reached maximum levels when the plants stopped growing. Dehydrogenase, polyphenol oxidase, and peroxide activities exhibited similar vertical distributions (i.e., surface > middle > lowest), whereas nitrate reductase activity exhibited the opposite trend. There were significant positive correlations between nitrate reductase activity and the removal rate of NO_3^- -N ($R^2=0.6783$, $P=0.0444$) and between dehydrogenase activity and the removal rate of COD_{Mn} ($R^2=0.6768$, $P=0.0439$). The activities of polyphenol oxidase and peroxidase were not significantly correlated with the removal rates of TN, NO_3^- -N, TP, PO_4^{3-} -P, and COD_{Mn} . Accordingly, dehydrogenase can be used as an indicator of the effectiveness of COD_{Mn} removal in constructed wetlands, and nitrate reductase activity can be used as an indicator of the effectiveness of NO_3^- -N removal.

Key words: constructed wetland; oxidoreductase; spatiotemporal distribution; enzyme activity; water purification; correlation

Corresponding author: ZHU Jian. E-mail: zhuj@ffrc.cn