

DOI: 10.12264/JFSC2021-0345

复合垂直流人工湿地植物与基质层微生物群落特征比较分析

赵可歆^{1,2}, 尹振东¹, 张可可¹, 唐小双¹, 崔正国¹, 曲克明¹

1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东省渔业资源与生态环境重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海海洋大学国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306

摘要: 为了解复合垂直流人工湿地系统对海水养殖尾水中各形态氮的处理效果, 以及植物与不同基质层微生物群落特征的相似性和差异性, 以互花米草(*Spartina alterniflora*)-细砂-煤渣-碎石构建的复合垂直流人工湿地系统为研究对象, 研究了该系统对海水石斑鱼养殖尾水中 COD、NO₃-N、NO₂-N、NH₄⁺-N 和总氮(TN)的去除效果, 并采用高通量测序技术分析了植物根际和不同基质层微生物群落特征。结果表明, 复合垂直流人工湿地系统对污染物有较好的去除效果, 出水中 COD、NO₃-N、NO₂-N、NH₄⁺-N 和 TN 的平均浓度分别为 4.00 mg/L, 0.15 mg/L, 0.16 mg/L, 0.04 mg/L, 0.64 mg/L。植物根际样品和细砂层样品的微生物群落丰富度和多样性较高, 与其他基质层样品具有明显差异; 在门分类水平上优势菌以变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、绿弯菌门和厚壁菌门为主, 相对丰度分别为 53.7%、11.5%、11.9%、6.4%、3.7%; 在纲分类水平优势菌以 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲、放线菌纲和拟杆菌纲为主, 相对丰度分别为 30.1%、20.9%、11.9%、10.3%; 人工湿地中丰度最高的脱氮功能菌包括亚硝化单胞菌属、硝化螺菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属和不动杆菌属; 系统中微生物代谢功能丰富, 且所有样品功能组成相似; 相同基质层样品的微生物群落组成差异较小, 二级湿地单元各基质层样品微生物群落的差异程度与一级湿地单元相比较小。

关键词: 人工湿地; 高通量测序; 微生物群落; 生物脱氮

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)06-0874-16

人工湿地是一种通过模拟自然湿地净化原理而构造的复合系统, 它利用基质、植物和微生物的过滤、吸附、离子交换、植物吸收和微生物降解等物理、化学和生物综合作用来实现水质的高效净化^[1-2]。人工湿地因其工艺简单、投入少、能耗小、抗冲击负荷能力强、水处理效果好和生态效益显著等优势, 近年来在淡水养殖尾水处理领域逐渐得到应用^[3-4], 而由于受盐度影响, 在海水养殖尾水处理中应用的成功案例较少^[5-6]。氮是养殖尾水的主要污染物, 若不处理直接排放会导致局部水体富营养化^[7]。人工湿地中氮主要依赖微生物的硝化和反硝化等作用脱除^[8-9], 稳定的微

生物群落是人工湿地系统物质循环和高效脱氮的重要保障^[10-11]。因此, 探究海水养殖尾水人工湿地处理系统中微生物群落的结构和功能对提高水质净化效果的影响具有重要意义^[12]。

由于 rRNA 基因序列的高度保守性, 基于 16S rRNA 的现代分子生物学方法已广泛应用于微生物生态学中^[13-14], 如变性梯度凝胶电泳(DG-GE)^[15-17]、限制性片段长度多态性分析(RFLP)^[18]、荧光原位杂交技术(FISH)^[19]、实时荧光定量 PCR 技术(Q-PCR)^[20]等。但这些方法难以检测到低丰度的功能菌^[21], 且不能对微生物群落进行同步定量分析, 使微生物群落特征与功能研究受到限制^[22]。

收稿日期: 2021-07-26; 修订日期: 2021-08-23.

基金项目: 山东省重大科技创新工程专项课题项目(2018SDKJ0503-1); 国家重点研发计划项目(2019YFD0900500); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD49).

作者简介: 赵可歆(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为工厂化循环水养殖系统中氮的迁移转化与调控技术. E-mail: 1141878220@qq.com

通信作者: 崔正国, 博士, 研究员, 研究方向为海洋渔业环境保护. E-mail: cuizg@ysfri.ac.cn

高通量测序技术可以同时为几百万条 DNA 分子进行序列测定^[23-24], 运行快、成本低^[22,25], 因此已逐渐成为微生物群落特征研究的重要手段^[26-27]。

近年来, 关于人工湿地中微生物群落特征的研究, 多数学者关注植物、基质和水力条件对微生物群落结构的影响^[28-29], 对不同基质层微生物群落组成及变化特征的研究较少。本研究在实验室前期研究的基础上, 以细砂、煤渣和碎石为基质, 构建了复合垂直流人工湿地系统, 采用高通量测序技术, 分析了人工湿地系统(上、下行池)不同基质层及根际微生物群落特征, 旨在揭示人工湿地系统脱氮效率与微生物群落结构的关系, 为阐明人工湿地内部各基质层脱氮机理提供理论参考, 并为构建高效的海水人工湿地系统提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 人工湿地构建

构建的复合垂直流人工湿地中试系统位于山东省海阳市某水产有限公司, 该处理系统包括 6 个单元: 沉淀池、一级湿地下行池、一级湿地上

行池、二级湿地下行池、二级湿地上行池和储水池, 面积约 19 m²。其中沉淀池长×宽×高为 2.63 m×1.07 m×1.71 m, 4 个上下行池为 2.23 m×2.14 m×1.71 m, 储水池为 3.27 m×2.63 m×1.71 m。人工湿地内选用 3 种粒径不同的基质进行填充, 自下而上粒径逐渐变小, 依次为碎石 50 cm (粒径 5~15 cm)、煤渣 35 cm (粒径 3~10 cm)、细砂 10 cm (粒径 1~5 mm)。种植植物为互花米草(*Spartina alterniflora* Loisel), 密度为 120~150 株/m²(图 1)。互花米草具有根系发达、耐高盐、氮磷吸收能力强等优点, 但因其是我国沿海地区的生物入侵种, 采用互花米草作为人工湿地植物进行水处理时必须封闭系统中, 以防止其可能产生的生态风险。此外, 为了控制其生态风险, 作者在植物开花时及时剪掉花穗, 使其无法授粉; 在实验结束后, 将植物根茎铲除^[30-31]。养殖池排放的尾水经沉淀池初步过滤后, 通过水泵依次流入一级湿地下行池、一级湿地上行池, 再通过管道自流入二级湿地下行池、二级湿地上行池, 最后收集于蓄水池(图 2)。

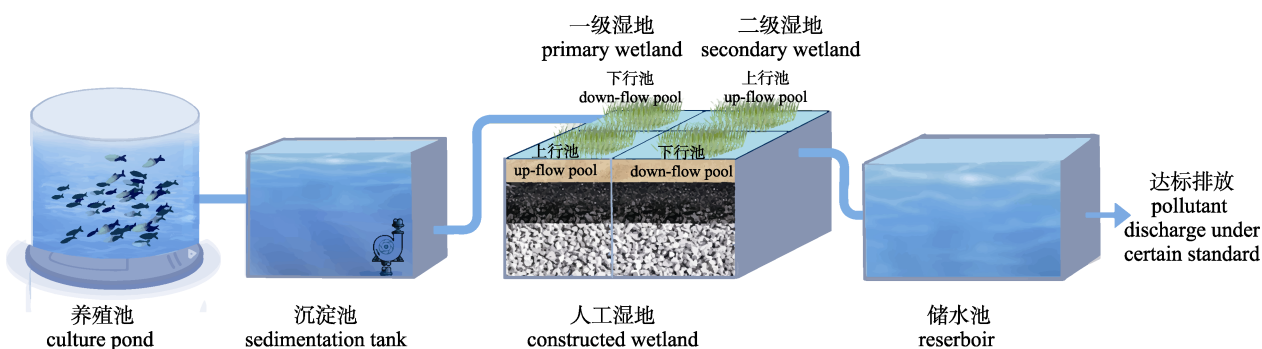


图 1 复合垂直流人工湿地系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of integrated vertical flow constructed wetland system

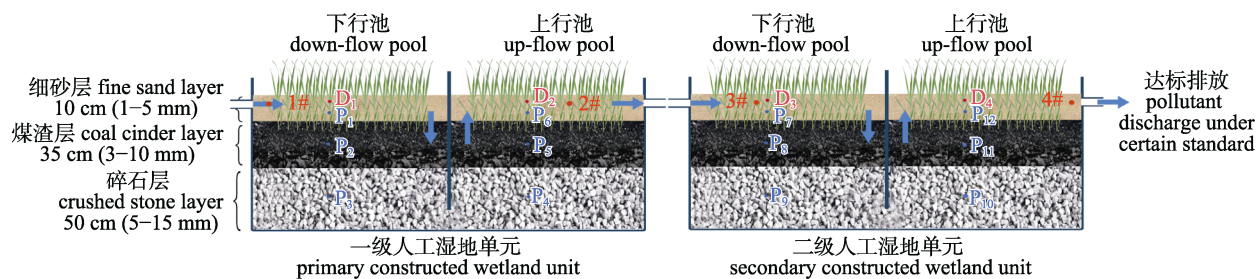


图 2 复合垂直流人工湿地系统剖面图(箭头指水流方向)

1[#]、2[#]、3[#]、4[#]分别为水质分析采样点; D₁–D₄为植物根际样品微生物检测采样点; P₁–P₁₂为基质层样品微生物检测采样点。

Fig. 2 Profiles for integrated vertical flow constructed wetland system (arrows show water flow directions)

1[#]、2[#]、3[#]、4[#] are sampling sites for water quality analysis. D₁–D₄ and P₁–P₁₂ are sampling sites for microbial detection in the plant rhizosphere and different substrate layers, respectively.

人工湿地系统于 2019 年 8 月试运行, 首先在人工湿地系统中泵入海水养殖石斑鱼尾水循环 1 周, 然后选择植株均匀且生长状况良好的互花米草进行培植, 控制水力停留时间为 1.5 h, 水力负荷为 12.6 m³/d, 再运行 1 个月。2019 年 9 月系统出水水质指标基本稳定, 达到尾水排放标准, 此时认为微生物已处于基本稳定状态, 系统正式运行。实验期间系统稳定运行 3 个月, 定时测定水质指标。

1.2 样品采集

为了解人工湿地系统不同处理单元对污染物的去除效果, 于一级湿地下行池进水口、一级湿地上行池出水口、二级湿地下行池进水口、二级湿地上行池出水口共设置 1[#]、2[#]、3[#]、4[#]共 4 个水质分析采样点(图 2)。为了减少误差, 平行取样两次, 采集的水样过滤后装于聚乙烯瓶中。系统试运行期间, 先将水样保存在-20 ℃冰箱, 每 2 d 集中检测; 系统正式运行期间, 立即送回实验室检测。

为了系统分析人工湿地系统植物及不同基质层微生物群落的相似性与差异性, 共设置 16 个微生物检测采样点: 在人工湿地系统下行池和上行池中, 利用五点取样法^[32]采集植物根际样品, 分别标记为 D1、D2、D3、D4; 在各基质层中部按照水流方向采集基质层样品, 分别标记为 P3、P4、P5、P6、P7、P8、P9、P10、P11、P12, 其中 P1、P6、P7、P12 是细砂层样品, P2、P5、P8、P11 是煤渣层样品, P3、P4、P9、P10 是碎石层样品, 每层样品设置 2 个平行样, 共 32 个样品。采集的样品置于-80 ℃冰箱保存至测序。

1.3 水质指标测定与分析

温度、盐度、pH、DO 等水质指标用 YSI 多参数水质分析仪测定; TN 采用岛津 TOC 测定仪测定; TP 采用过硫酸钾氧化法; NH₄⁺-N 的测定采用次溴酸盐氧化法; NO₂⁻-N 的测定采用萘乙二胺分光光度法; NO₃⁻-N 的测定采用锌镉还原法; COD 的测定采用碱性高锰酸钾法。

1.4 微生物群落分析

通过试剂盒抽提基因组 DNA, 并用超微量分光光度计(NanDrop2000)测定 DNA 的浓度和纯

度。用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA, 按指定测序区域, 合成带有 barcode 的特异引物, 进行 PCR 扩增。细菌 16S rRNA 基因扩增的上下引物为 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCA-GCAG-3'; 806R: 5'-GGCTACHVGGGTWTCCTA-AT-3'。PCR 扩增程序为: 95 ℃预变性 3 min; 95 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 循环 27 次; 72 ℃延伸 7 min, 终止温度 10 ℃。通过 2%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 再用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN 公司)切胶回收 PCR 产物, Tris-HCL 洗脱, 2%琼脂糖电泳检测; 利用 Quanti-Fluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega 公司)进行 Illumina MiSeq 2×300 bp 高通量测序及生物信息学分析。

1.5 数据统计分析

实验数据处理采用美吉生物云平台、Origin 2019 和 Microsoft office Excel 2019。将 Miseq 测序得到的 PE reads 根据 overlap 关系进行拼接, 同时对序列质量进行质控和过滤, 区分样本后进行 OTU 聚类分析和物种分类学分析。基于 OTU 聚类分析结果, 检测测序深度, 分析物种多样性指数; 基于分类学信息, 在微生物各个分类水平上进行群落结构的统计分析。在上述分析的基础上, 对多样本的群落结构进行统计学和可视化分析。

2 结果与分析

2.1 除氮效果分析

实验期间, 水温为(23.9±1.7) ℃, 溶解氧为(5.6±0.4) mg/L, 盐度为 30.9±1.0, pH 为 8.1±0.3。经沉淀池过滤后入水口的 COD 初始含量为(7.84±1.62) mg/L, 出水含量为(4.00±1.38) mg/L, COD 的含量降低 48.98%。COD 含量明显下降, 符合《海水养殖水排放要求》(SC/T 9103-2007)一级标准(COD≤10 mg/L)。经一、二级人工湿地单元处理后, NO₃⁻-N、NH₄⁺-N 和总氮(TN)含量分别降低 92.10%、94.49%和 78.36%, NO₂⁻-N 的平均浓度变化范围是 0.03~0.16 mg/L(表 1)。NO₃⁻-N 和 NH₄⁺-N 占比呈逐渐上升趋势, NO₂⁻-N 占比呈逐渐下降趋势(图 3)。无机氮含量符合《海水养殖水排放要求》(SC/T 9103-2007)一级标准(无机氮≤0.50 mg/L)。人

工湿地系统中不同采样点污染物去除率之间存在差异显著, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 在 2[#]采样点处去除率为 71.4%, 出水去除率为 93.2%; $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 在 2[#]采样点处去除率为 73.0%, 出水去除率为 92.2%; TN 在 2[#]采样点处去除率为 67.0%, 出水去除率为 78.3%, 由此可见, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 TN 的去除主要发生在一级湿地。 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 在 2[#]采样点处积累 0.064 mg/L, 出水中积累 0.134 mg/L, $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 在一级湿地和二级湿地的积累量基本相同。

表 1 人工湿地系统中各形态氮浓度变化
Tab. 1 Concentration variations of $\text{NO}_3^- \text{-N}$, $\text{NO}_2^- \text{-N}$, $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ and TN in constructed wetland

采样点 sampling site	$\text{NO}_3^- \text{-N}$	$\text{NO}_2^- \text{-N}$	$\text{NH}_4^+ \text{-N}$	TN
1 [#]	2.172±0.034	0.025±0.001	0.488±0.005	2.940±0.024
2 [#]	0.621±0.018	0.089±0.002	0.132±0.003	0.971±0.152
3 [#]	0.422±0.030	0.106±0.003	0.097±0.004	0.793±0.020
4 [#]	0.147±0.030	0.159±0.002	0.038±0.007	0.637±0.020

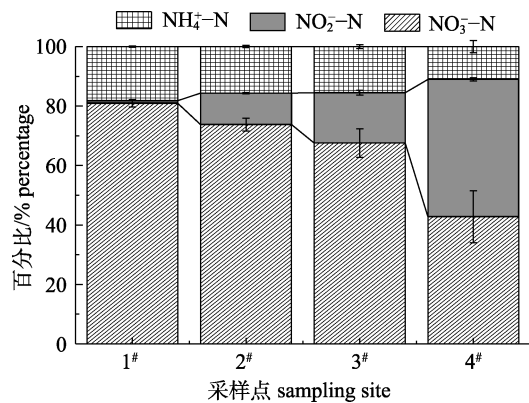


图 3 人工湿地系统中不同形态氮占无机氮比例变化
Fig. 3 Variations of the proportion of $\text{NO}_3^- \text{-N}$, $\text{NO}_2^- \text{-N}$, $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ to dissolved inorganic nitrogen in constructed wetland

2.2 微生物样品测序质量与复杂度分析

采用 Illumina 高通量测序获得不同样品原始序列数据, 再经剪切过滤低质量序列后, 得到各样品组有效序列范围为 34398~54141 条, 碱基数范围为 15524784~28511770 个, 平均长度为 411~420 bp (表 2)。经 97%相似性聚类后共涵盖 1 域 1 界 48 门 109 纲 333 目 630 科 1444 属 2869 种 8135 OTUs。稀释性曲线能够检验测序量是否能涵盖所有微生物群落, 本实验测序量超过 33000

时, 曲线趋于平坦, 这说明测序数据量合理, 测序深度已经覆盖了样品中绝大多数物种(图 4)。

表 2 高通量测序结果
Tab. 2 High-throughput sequencing results

采样点 sampling site	原始序列数 raw read	OTU	碱基数 base number	平均长度 average sequence length	序列长度范围 sequence length distribution
D1	66533	34398	27353642	411	206–456
D2	61016	34892	25058120	411	207–464
D3	67475	39496	27882200	413	219–504
D4	61470	35474	25337817	412	219–462
P1	63804	44994	26572721	416	215–502
P2	37023	34937	15524784	420	251–494
P3	42425	35585	17527386	413	298–528
P4	46702	44101	19347199	414	302–452
P5	42400	40359	17641196	416	364–462
P6	64865	50597	26987962	416	216–479
P7	68705	51542	28511770	415	203–474
P8	62690	48643	26127385	417	216–458
P9	66461	41056	27621016	416	247–465
P10	43059	40665	17876105	415	237–432
P11	63233	54141	26367486	417	238–476
P12	56801	45449	23591081	415	227–477

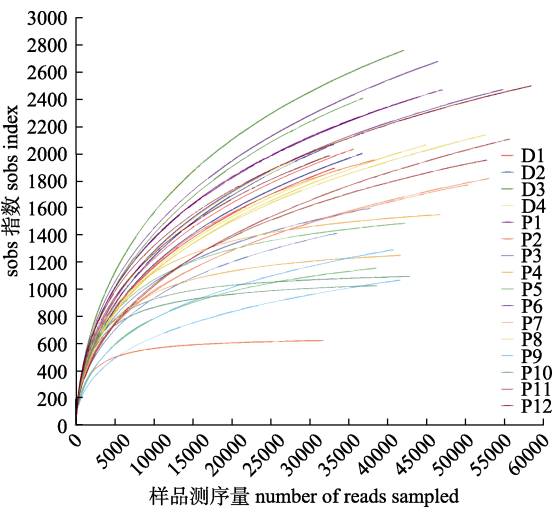


图 4 基于高通量测序结果的稀释性曲线
Fig. 4 Rarefaction curve for high-throughput sequencing

2.3 多样性分析

采用 ace、chao、sobs、Simpson 指数对人工湿地中微生物群落的 α 多样性进行分析, ace 指数、chao 指数和 sobs 指数反映了微生物群落丰富度, Simpson 指数反映了微生物群落多样性。本实

验所有样品的测序覆盖率均在 0.992 以上,说明测序覆盖了样品中绝大部分微生物,可以满足微生物群落多样性分析的需要。由图 5 可以看出,植物根际样品(D1~D4)、细砂层样品(P1, P6, P7, P12)

和二级湿地上行池煤渣层样品(P8, P12)的 ace、chao 和 sobs 指数较高,表明其微生物群落丰富度较高,细砂层样品(P1, P6, P12)的 Simpson 指数较低,表明其微生物群落多样性较高。

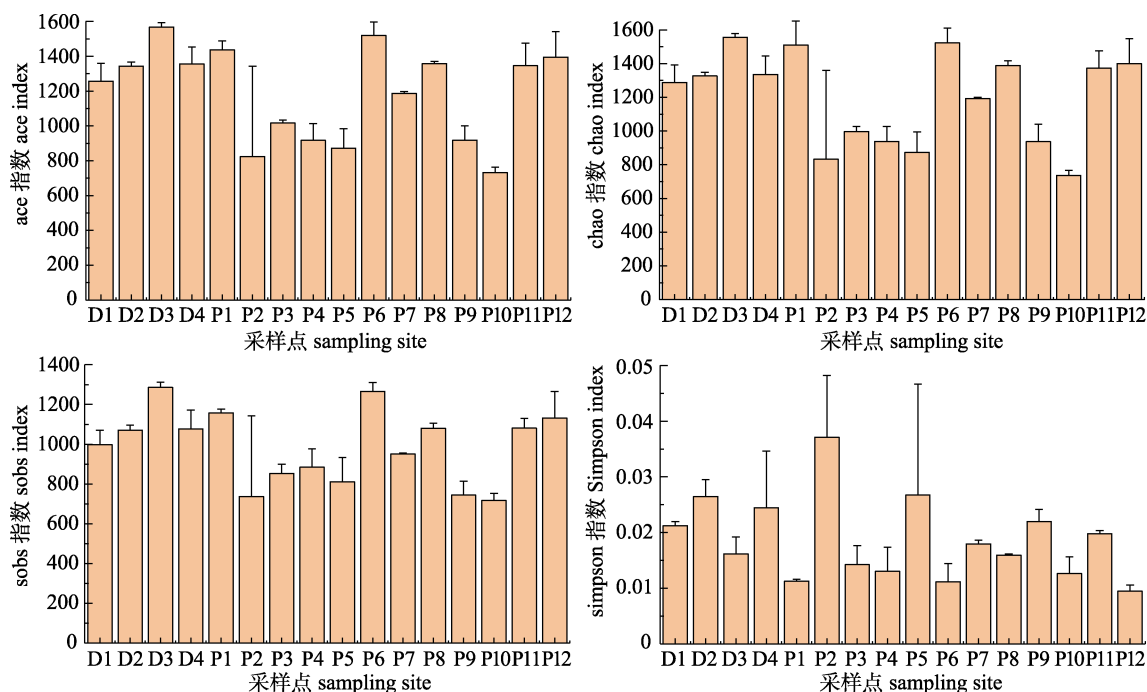


图 5 人口湿地系统中不同取样点的微生物 alpha 多样性分析

采样点位置如图 2 所示。

Fig. 5 Alpha diversity analysis of microbial community at different sampling sites in constructed wetland
The sampling sites are shown in fig. 2.

2.4 不同水平微生物群落组成分析

为了解微生物在植物根际和各基质层的群落组成和功能,在不同分类水平上对微生物群落组成进行分析,结果表明,人工湿地门、纲水平上植物根际样品和各基质层样品的微生物群落组成基本相同,其中优势菌门有变形菌门(Proteobacteria, 53.7%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 11.5%)、放线菌门(Actinobacteria, 11.9%)、绿弯菌门(Chloroflexi, 6.4%)、厚壁菌门(Firmicutes, 3.7%)、蓝细菌门(Cyanobacteria, 2.7%)、Patescibacteria (2.2%)和浮霉菌门(Planctomycetes, 1.7%)(图 6a)。优势菌纲有 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria, 30.1%)、 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria, 20.9%)、放线菌纲(Actinobacteria, 11.9%)、拟杆菌纲(Bacterodia, 10.3%)(图 6b)。

此外,为了进一步了解各基质层样品在种水平上微生物群落组成的相似性和差异性,根据各基质层样品在种水平上的物种注释及丰度信息,选取微生物群落相对排名较高的 10 个种,并结合其在单个样品中的微生物群落相对丰度信息,构建了含有各基质层样品聚类关系树的热图。由图 7 可知,微生物群落经聚类分析后成为四大分支,植物根际样本(D1, D2, D3, D4)构成一支,细砂层样本(P1, P7, P12)构成一支,煤渣层样本(P2, P5, P8, P11)和细砂层样品 P6 构成一支,碎石层样本(P3, P4, P9, P10)构成一支,这说明不同基质层样品之间的微生物群落有明显不同。植物根际样本与细砂层样本和煤渣层样本的微生物群落进化关系距离较近,但与碎石层样本样本较远,说明相对于碎石层样本,植物根际样本与细砂层样本和

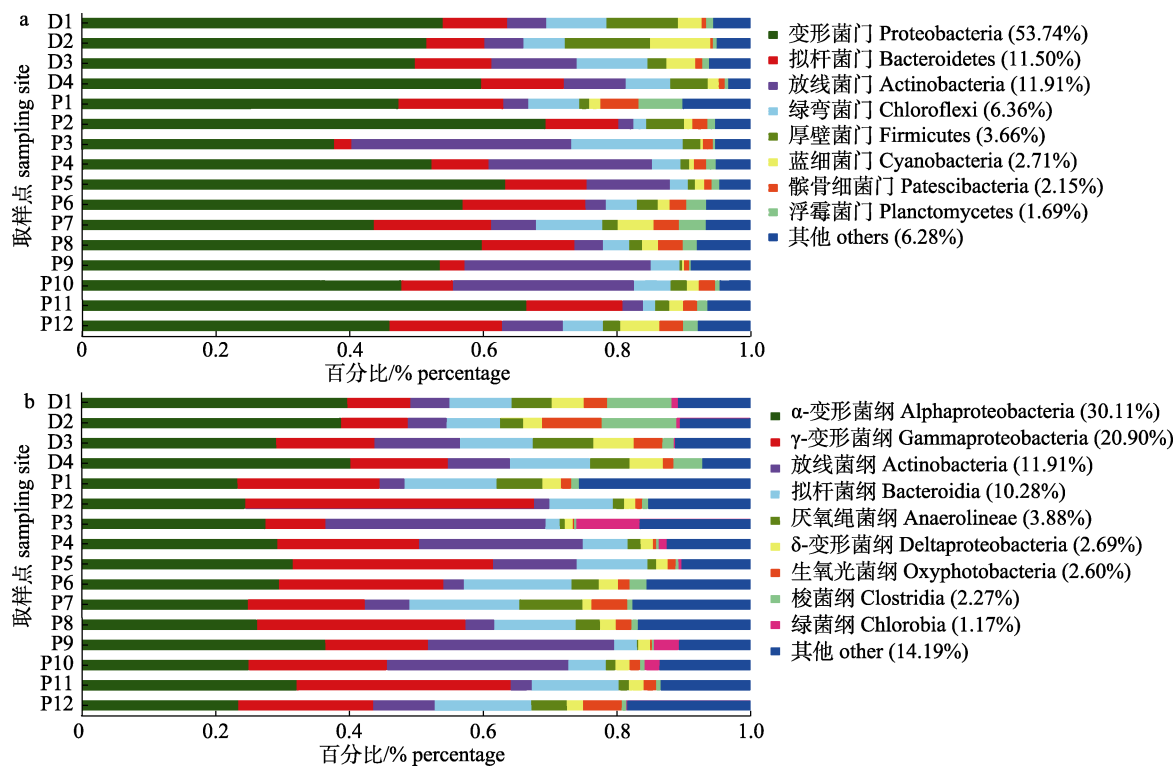


图 6 人工湿地系统中门、纲分类水平上细菌菌落组成
采样点位置如图 2 所示.

Fig. 6 Compositions of bacterial colonies at the classification levels of phylum and class in comstructed wetland
The sampling sites are shown in fig. 2.

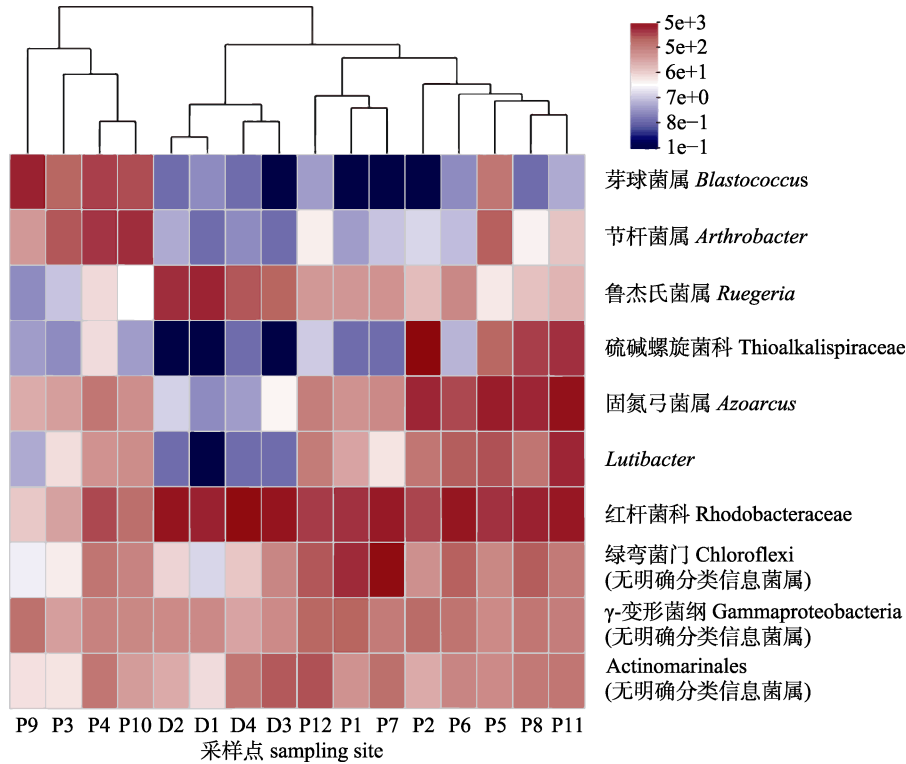


图 7 人工湿地中微生物群落聚类热图

Fig. 7 The clustering heatmap of microbial community in constructed wetland

煤渣层样本微生物群落组成和聚集规律更相似,这可能是由于植物根际与细砂层接触,同时有少量长势较好的根蔓延到了煤渣层。

2.5 脱氮功能菌分析

人工湿地的脱氮功能菌在脱氮过程中发挥着至关重要的作用。本系统的脱氮功能菌包括氨氧化细菌、亚硝酸盐氧化细菌和反硝化细菌。氨氧化细菌包括亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)和亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*),亚硝酸盐氧化细菌包括硝化螺菌属(*Nitrospira*),反硝化细菌包括不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、罗思河小杆菌属(*Rhodanobacter*)、索氏菌属(*Thauera*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、嗜

酸菌属(*Acidovorax*)、嗜氢菌属(*Hydrogenophaga*)、生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)和硫杆菌属(*Thiobacillus*)。本研究人工湿地中除氮功能菌丰度如表 3 所示,其中反硝化细菌总丰度最高(0.3745%),其次是亚硝酸盐氧化细菌(0.1551%)和氨氧化细菌(0.1519%)。在优势菌属中硝化螺菌属丰度最高(0.1551%),其次是亚硝化单胞菌属(0.1484%)、芽孢杆菌属(0.1294%)、假单胞菌属(0.0823%)和不动杆菌属(0.0634%)。同时对比各采样点微生物序列数可知,氨氧化细菌和亚硝酸盐氧化细菌主要分布在一级湿地,反硝化细菌主要分布在二级湿地。而且植物根际样品中的亚硝酸盐氧化细菌数量高于基质样品,但反硝化细菌少于基质样品。

表 3 人工湿地中除氮相关功能细菌丰度
Tab. 3 Abundance of nitrogen removal related functional bacteria in constructed wetland

代谢方式 metabolize manner	生物学分类 scientific classification	序列数 sequence number								总丰度/% total abundance
		D1	D2	D3	D4	P(1-3)	P(4-6)	P(7-9)	P(10-12)	
氨氧化 ammonoxidation	亚硝化单胞菌属 <i>Nitrosomonas</i>	206	257	39	33	557	665	420	744	0.1484
	亚硝化螺菌属 <i>Nitrosospira</i>	—	—	—	—	2	6	2	58	0.0035
亚硝酸盐氧化 nitrite oxidation	硝化螺菌属 <i>Nitrospira</i>	776	775	216	24	360	468	171	237	0.1551
反硝化 denitrification	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	1	—	—	1	248	217	145	619	0.0634
	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	10	85	15	37	172	211	150	926	0.0823
	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	111	112	243	209	364	285	301	900	0.1294
	罗思河小杆菌属 <i>Rhodococcus</i>	59	128	2	6	6	11	7	165	0.0190
	嗜酸菌属 <i>Acidovorax</i>	—	1	—	1	37	64	92	241	0.0223
	嗜氢菌属 <i>Hydrogenophaga</i>	6	1	1	—	—	12	122	354	0.0254
	生丝微菌属 <i>Hyphomicrobium</i>	2	2	—	2	18	54	16	106	0.0102
	硫杆菌属 <i>Thiobacillus</i>	—	—	1	—	—	2	58	74	0.0069
	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	3	5	6	2	15	18	44	43	0.0070
	索氏菌属 <i>Thauera</i>	—	—	—	—	—	—	1	32	0.0017
	红球菌属 <i>Rhodanobacter</i>	—	—	18	1	1	2	1	3	0.0069

2.6 微生物样品代谢功能分析

为了探究植物根际与基质间微生物的代谢功能差异,各样品间的同源蛋白簇(clusters of orthologous groups, COG)代谢功能组成分析结果表明,湿地内所有植物根际样品和基质样品的 COG 功能组成较为相似(图 8)。主要的 COG 功能包括:能量生产与转换、氨基酸转运与代谢、核苷酸转运与代谢、碳水化合物转运与代谢、辅酶转运与

代谢、脂质转运与代谢、无机离子转运与代谢、转录、复制重组与修复、细胞壁/膜包膜生物发生、细胞运动、次生代谢产物生物合成、运输和分解代谢等。该分析结果表明,本研究中人工湿地系统的微生物代谢功能非常丰富,这有利于湿地中碳、氮、硫等元素的循环。

2.7 β 多样性分析

PCA (principal component analysis)分析可以

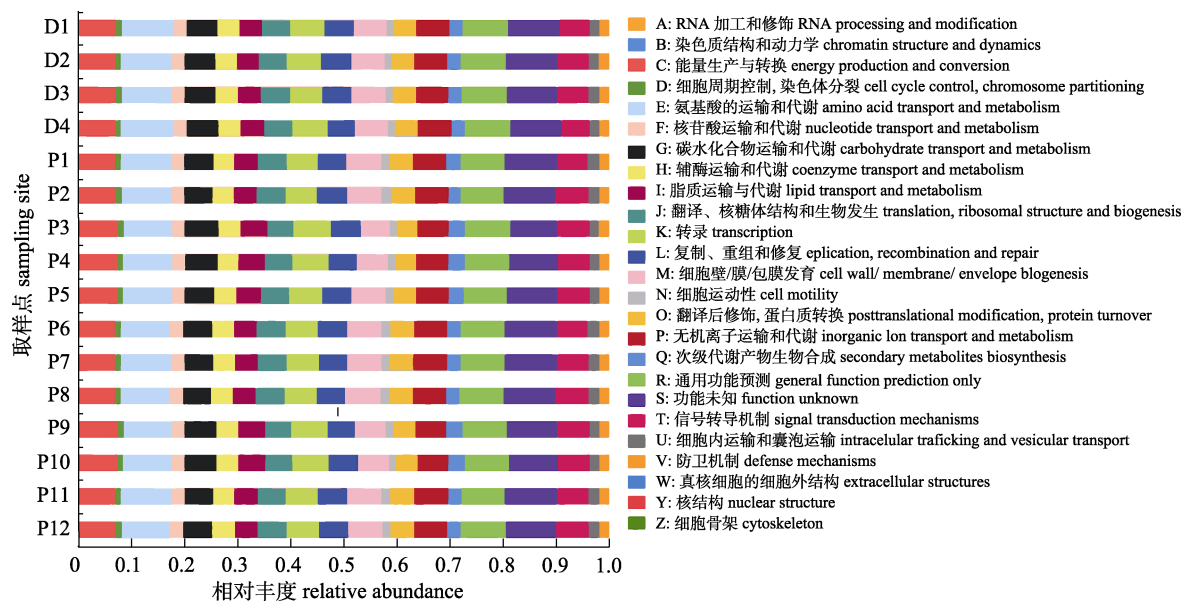


图 8 人工湿地中微生物同源蛋白簇(COG)功能预测

Fig. 8 Prediction of microbial clusters of orthologous groups (COG) function in constructed wetland

通过不同样本 OTU 组成反映样本间的差异和距离, 样本组成越相似, 反映在 PCA 图中相应坐标轴上的距离越近。结果表明(图 9)一级湿地中植物根际样品(D1、D2)相近, 细砂层样品(P1、P6)相近, 煤渣层样品(P2、P5)相近, 碎石层样品(P3、P4)相近, 说明在相似环境下有相对稳定的微生物群落组成关系。细砂层样品(P1、P6)与植物根际样品(D1、D2)相距较近, 这是由于植物根际与细砂层接触, 具有较相似的环境, 因此具有较相似的微生物群落特征。在二级湿地中植物根际样品和细砂层样品(D3、D4、P7、P12)相近, 煤渣层样品(P8、P11)相近, 碎石层样品(P9、P10)相近, 也

说明在相似环境下有相对稳定的微生物群落组成关系, 表现出与一级湿地相似的分析结果。

PLS-DA (partial least squares discriminant analysis)分析可以通过对组间观察值进行有效区分, 在反映样本间差异和距离的同时, 观察到各样本的离散程度。一级湿地植物根际样品(D1、D2)相近, 并与各基质层样品(P1、P2、P3、P4、P5、P6)相距较远(图 10a), 二级湿地植物根际样品(D3、D4)相近, 并与各基质层样品(P7、P8、P9、P10、P11、P12)相距较远(图 10b), 说明不同环境下微生物群落组成差异较大。同时对比图 10a 和图 10b 可以发现一级湿地基质样品离散程度大于二级湿地。

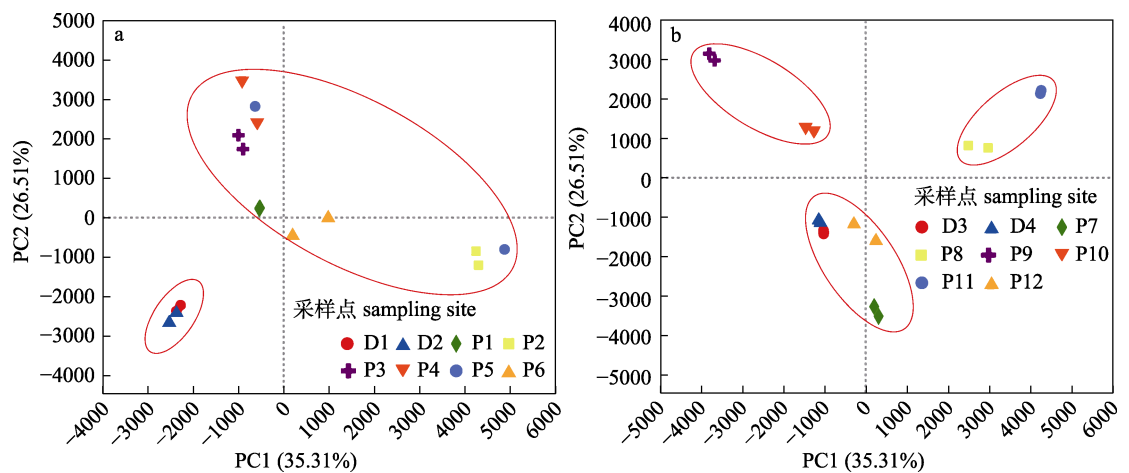


图 9 人工湿地中微生物群落主成分分析

Fig. 9 PCA analysis of microbial community in constructed wetland

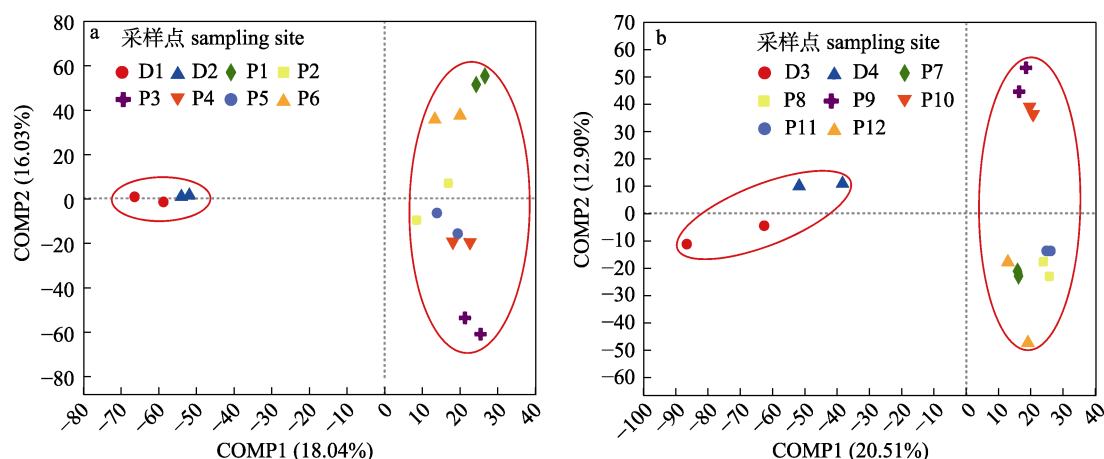


图 10 人工湿地中微生物群落偏最小二乘法判别分析

Fig. 10 PLS-DA analyse of microbial community in constructed wetland

3 讨论

3.1 不同水平微生物群落组成及多样性分析

本实验中植物根际样品和细砂层样品具有较高的丰富度和多样性,这是由于人工湿地中的植物通过光合作用在根区还原态介质中形成了氧化态微环境^[33],根区有氧区域和厌氧区域共同存在为根区好氧、兼性厌氧和厌氧微生物提供了各自适宜的小生境,促进了微生物的生长和繁殖^[34];同时由于细砂层样品与植物根际接触,相较其他基质层有更高的群落丰富度及多样性。

综合一级湿地和二级湿地的 PLS-DA 结果,人工湿地中植物根际样品微生物群落组成相似,主要是因为植物根际分泌的各种次生代谢物质对根区附近的微生物数量、种类、分布和活性有很大影响^[35]。同时可以看出一级湿地中的基质样品离散程度大于二级湿地,这可能是由于一级湿地是尾水净化的主要场所,一级湿地中的氮、磷等污染物含量以及溶解氧、盐度等相关影响因素沿水流方向变化梯度较大,造成微生物生长环境变化也较大,因此微生物群落组成差异比较明显。而经过一级湿地的下行池和上行池处理过的尾水中各种污染物的浓度已经较低,各种影响因素沿水流方向变化梯度较小,微生物生长环境变化也较小,也即微生物生长环境趋于相似,因此二级人工湿地微生物群落组成差异较一级人工湿地小。

本研究中整个人工湿地中试系统植物根际样品和各基质层样品的优势菌门基本相同,有变形菌门、拟杆菌门、放线菌门等。其中变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、厚壁菌门作为优势菌门和前人研究结果基本一致^[36-38]。变形菌门在各层样品中均具有较大丰度,此研究结果与之前有关人工湿地的研究结果一致^[39-42]。变形菌门包含参与硝化作用的氨氧化细菌和亚硝酸盐氧化细菌以及大部分的反硝化细菌^[43-44],这些细菌在生物脱氮过程中具有非常重要的作用^[45-46]。拟杆菌门和厚壁菌门的细菌能降解多种有机污染物,对反硝化作用具有重要的影响^[47]。放线菌门在基质下层(碎石层 P3、P4、P9、P10)的丰度明显大于其他基质层,这是由于放线菌门在寡营养胁迫条件下也能生长,甚至能寻觅并利用非营养物质^[48],基质下层存在营养物质缺乏的问题,这使放线菌门在碎石层竞争力较强。其中绿弯菌门作为优势菌门可能是由于其在枯枝烂叶分解过程的碳循环中具有潜在作用^[12]。植物根际样品和各基质层样品的优势菌纲也基本相同,有 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲、放线菌纲、拟杆菌纲。各层样品均有 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲且丰度较大,这与前人的研究结果基本一致^[12,49-50]。这是由于 α -变形菌纲的外观较为独特,附有菌柄,能够增加表面积和容积比,对环境的适应能力较强,可以通过多种途径利用营养,即使在贫营养环境下也能生存^[51]; γ -变形菌纲属于革兰氏阴性菌,对于污染物的生物降解能

力较强^[12,52]。虽然之前也有少量研究报道了不同人工湿地纲水平上微生物群落组成,但关于人工湿地的优势菌纲仍存在争议,不同的人工湿地往往会有不同的优势菌纲^[53-54],这主要是由于湿地运行参数、湿地类型、处理尾水的差异等多种原因^[55]。

在淡水养殖尾水人工湿地处理系统中优势菌门主要有变形菌门、蓝细菌门、浮霉菌门和放线菌门^[56];优势菌纲主要有 α -变形菌纲、 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)、 γ -变形菌纲、 ϵ -变形菌纲(Epsilonproteobacteria)、 δ -变形菌纲(Deltaproteobacteria)、放线菌纲、拟杆菌纲和硝化螺旋菌纲(Nitrospirae)^[3]。这与本研究以及其他海水养殖尾水人工湿地处理系统中优势菌门和优势菌纲基本一致,但硝化螺旋菌纲在淡水养殖尾水人工处理系统中丰度较高,这可能是由于淡水盐度较低的影响。

3.2 人工湿地的除氮效果及脱氮功能菌

经一、二级人工湿地单元处理后, NO_3^- -N、 NH_4^+ -N 和 TN 均具有较高去除率。 NO_3^- -N 和 TN 具有较高去除率可能是由于 9—11 月植物生长旺盛,使植物可以通过发达的根系吸收污染物,同时植物也为微生物提供良好的生境,加快对营养盐的降解。硝化反应适宜温度在 30 °C 左右,实验期间的温度有利于硝化细菌生长,从而使 NH_4^+ -N 的去除率较高。 NO_2^- -N 不降反增,出水浓度保持在 0.16 mg/L 左右,其原因可能是由于反硝化过程中 NO_2^- -N 的还原速率低于 NO_3^- -N 生成 NO_2^- -N 的速率,也可能是由于人工湿地内部 DO 含量较低,硝化反应不能完全进行。

本实验中反硝化细菌和氨氧化细菌拥有较高丰度,使 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N 和 TN 可以通过硝化作用和反硝化作用高效去除。各层样品中均能检测到硝化螺菌属,硝化螺菌属属于亚硝酸盐氧化细菌,对生物脱氮有重要作用。硝化螺菌属的丰度与进水 pH 值成正相关,本研究进水 pH 为 8.1 左右,这可能是该菌属在系统中含量较高的原因^[57]。此外硝化螺菌属在一级湿地含量较二级湿地含量高,其原因可能是二级湿地内部溶解氧含量较低,抑制了硝化反应的进行。亚硝化单胞菌属属于氨氧化

细菌,在一级湿地下行池和一级湿地上行池的植物根际处和细砂层比较丰富,这是由于氨氧化作用需要在有氧条件下进行,植物可以通过光合作用在根际处形成氧化态微环境,同时细砂层由于与种植植物和与空气接触也具有较高的溶解氧浓度。芽孢杆菌属属于反硝化细菌,是有机物降解菌,不仅能够还原硝酸盐和亚硝酸盐,还能起到生物固氮的作用,将水体里的无机氮转化成有机氮,为植物提供营养^[58]。假单胞菌属属于反硝化细菌,为好氧或兼性厌氧细菌,含有降解质粒,可以分解有机污染物,能够在有氧条件下利用好氧反硝化酶进行反硝化作用^[59]。不动杆菌属属于反硝化细菌,能够将 NO_3^- -N 通过异化还原作用转化为 NH_4^+ -N 以供湿地植物利用^[60]。其中需要注意的是反硝化细菌中的硫杆菌属,硫杆菌属能在厌氧条件下能通过反硝化作用参与氮、硫循环生成硫化物。当水体中的硫化物过高时,会不利于湿地植物的生长,也会抑制硝化反应的进行^[61]。本研究系统中的硫杆菌属大部分位于二级湿地的煤渣层,这表明煤渣中的硫杆菌属会参与硫化物的生成,进而影响系统的脱氮效果。

氨氧化细菌和亚硝酸盐氧化细菌主要分布在一级湿地,反硝化细菌主要分布在二级湿地,原因是一级湿地的溶解氧含量高于二级湿地,不适合反硝化细菌的生长。此外,反硝化细菌的丰度无论是在一级湿地还是二级湿地都很具有优势,这可能是由于本实验是处理海水养殖尾水的系统,其盐度较高,反硝化细菌的抗盐冲击能力强于硝化细菌^[62-63],随着盐度的升高,亚硝酸盐氧化菌先受到抑制,随后氨氧化细菌受到抑制,反硝化作用优势突出。

4 结论

(1) 经一、二级人工湿地单元处理后,出水中 COD、 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N 和 TN 的平均浓度分别为 4.00 mg/L、0.15 mg/L、0.04 mg/L 和 0.64 mg/L,去除率分别为 48.98%、92.10%、94.49%和 78.36%, NO_3^- -N 的平均浓度变化范围是 0.03~0.16 mg/L, COD 和无机氮浓度均符合《海水养殖水排放要求》(SC/T 9103-2007)中的一级标准。

(2) 本次测序深度已经覆盖了样品中绝大部分物种。采用 ace、chao、sobs、Simpson 指数对人工湿地中微生物群落的 α 多样性进行分析, 可以得出: 植物根际样品和细砂层样品的微生物群落丰富度多样性较高。

(3) 本研究的人工湿地中试系统中的优势菌门是变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、绿弯菌门和厚壁菌门, 占比分别为 53.7%、11.5%、11.9%、6.4%、3.7%; 系统中的优势菌纲是 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲、放线菌纲和拟杆菌纲, 占比分别为 30.1%、20.9%、11.9%、10.3%。在种水平上, 微生物群落经聚类分析后成为四大分支, 包括植物根际样品、细砂层样品、煤渣层样品和碎石层样品, 这说明不同基质层之间的微生物群落有明显不同。其中植物根际样品与细砂层样品和煤渣层样品的微生物群落进化关系距离较近, 但与碎石层样品较远, 说明相对于碎石层样品, 植物根际样品与细砂层样品和煤渣层样品微生物群落组成和聚集规律更相似。

(4) 该系统中丰度最高的脱氮功能菌包括亚硝化单胞菌属、硝化螺菌属和芽孢杆菌属、假单胞菌属和不动杆菌属, 它们分别参与硝化作用和反硝化作用。氨氧化细菌和亚硝酸盐氧化细菌主要分布在一级湿地, 反硝化细菌主要分布在二级湿地。而且无论在一级湿地还是二级湿地, 反硝化细菌的丰度都很具有优势。COG 功能预测显示系统中所有样品功能组成相似, 且微生物代谢功能丰富, 有利于生物脱氮的进行。

(5) 采用 PCA 和 PLS-DA 对人工湿地中微生物群落的 β 多样性进行分析, 可以得出: 植物根际样本、细砂层样本、煤渣层样本和碎石层样本微生物群落组成均具有差异, 但各层样本中不同取样点微生物群落组成差异较小, 因此相似的环境会保持相对稳定的微生物群落组成关系; 一级湿地基质样品微生物群落的差异程度要大于二级湿地。

参考文献:

[1] 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.

- [2] Zhang X, Yan M C, Xiao G Q, et al. Analysis of microbial community structure in mangrove constructed wetland-mariculture coupling system[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(3): 557-564. [张翔, 闫茂仓, 肖国强, 等. 虾-贝-红树林耦合循环水养殖系统中微生物群落分析[J]. *水生生物学报*, 2016, 40(3): 557-564.]
- [3] Lei X, Li B, Li X, et al. Rhizosphere microbial communities of three plants in vertical-flow constructed wetland[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(5): 1373-1381. [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.]
- [4] Tao Y, Zhu J, Li B, et al. An evaluation of purification effect of constructed wetland-pond recirculating aquaculture system based on nitrogen and phosphorus budgets[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2021, 51(2): 36-45. [陶冶, 朱健, 李冰, 等. 基于氮、磷收支的人工湿地-池塘循环水养殖系统净化效果评价[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2021, 51(2): 36-45.]
- [5] Wang N, Wang X C, Xiong J Q, et al. Engineering application of constructed wetland for tertiary treatment of tail water from wastewater treatment plants in industrial zone[J]. *Environmental Engineering*, 2017, 35(12): 11-14, 44. [王楠, 王晓昌, 熊家晴, 等. 人工湿地在工业园区污水厂尾水处理中的工程应用[J]. *环境工程*, 2017, 35(12): 11-14, 44.]
- [6] Tang X S, Zhang K K, Jia J, et al. Purification characteristics of constructed wetland under different hydraulic loads after treatment of marine aquaculture tailwater[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(5): 16-23. [唐小双, 张可可, 贾军, 等. 不同水力负荷下人工湿地对海水养殖尾水污染物的净化特征[J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(5): 16-23.]
- [7] Hayes M A, Jesse A, Tabet B, et al. The contrasting effects of nutrient enrichment on growth, biomass allocation and decomposition of plant tissue in coastal wetlands[J]. *Plant and Soil*, 2017, 416(1-2): 193-204.
- [8] Ligi T, Oopkaup K, Truu M, et al. Characterization of bacterial communities in soil and sediment of a created riverine wetland complex using high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing[J]. *Ecological Engineering*, 2014, 72: 56-66.
- [9] 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.

- [10] 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.
- [11] Fan H Q, Wang L W, Wang D, et al. High-throughput sequencing analysis of the bacterial communities in constructed wetland[J]. *Bulletin of Science and Technology*, 2019, 35(2): 213-219. [范海青, 王凌文, 王丹, 等. 基于高通量测序的人工湿地微生物群落分析[J]. *科技通报*, 2019, 35(2): 213-219.]
- [12] Fang Y H, Peng J F, Song Y H, et al. High throughput sequencing analysis of microbial communities in different plant rhizosphere in subsurface-flow constructed wetland[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2018, 38(3): 911-918. [房昀昊, 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.]
- [13] Ibekwe A M, Grieve C M, Lyon S R. Characterization of microbial communities and composition in constructed dairy wetland wastewater effluent[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5060-5069.
- [14] de C Baptista J, Davenport R J, Donnelly T, et al. The microbial diversity of laboratory-scale wetlands appears to be randomly assembled[J]. *Water Research*, 2008, 42(12): 3182-3190.
- [15] Tal Y, Watts J E M, Schreier H J. Anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2896-2904.
- [16] Zhang H G, Ma S S, Li Q F, et al. Analysis of the changes of microbial community structure on bio-carrier of recirculating aquaculture systems(RAS)[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(1): 231-239. [张海耿, 马绍赛, 李秋芬, 等. 循环水养殖系统(RAS)生物载体上微生物群落结构变化分析[J]. *环境科学*, 2011, 32(1): 231-239.]
- [17] Li Q F, Fu X J, Zhang Y, et al. PCR-DGGE analysis of bacterial communities in bio-filters of re-circulating mariculture system[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(4): 579-586. [李秋芬, 傅雪军, 张艳, 等. 循环水养殖系统生物滤池细菌群落的 PCR-DGGE 分析[J]. *水产学报*, 2011, 35(4): 579-586.]
- [18] Michaud L, Lo Giudice A, Troussellier M, et al. Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(6): 1935-1946.
- [19] Jin H, Tian M, Zhao W Z, et al. Effect of chemical enhanced phosphorus removal on biological phosphorus removal of A2/O process in wastewater treatment plant[J]. *China Water & Wastewater*, 2019, 35(23): 1-5. [金虎, 田敏, 赵文钊, 等. 化学强化除磷对污水厂 A²/O 工艺生物除磷的影响[J]. *中国给水排水*, 2019, 35(23): 1-5.]
- [20] Zhang Y, Li Q F, Cheng Y, et al. Establishment and application of a real-time PCR method for *Halomonas* in water[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2016, 22(1): 140-145. [张艳, 李秋芬, 成钰, 等. 水体中盐单胞菌属(*Halomonas*)细菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *应用与环境生物学报*, 2016, 22(1): 140-145.]
- [21] Margulies M, Egholm M, Altman W E, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 376-380.
- [22] Wang L, Li B, Zhu J. Review of high-throughput sequencing techniques on constructed wetland microbial diversity[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(5): 10-15. [王林, 李冰, 朱健. 高通量测序技术在人工湿地微生物多样性研究中的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2016, 32(5): 10-15.]
- [23] Chen Y, Wen Y, Tang Z R, et al. Effects of plant biomass on bacterial community structure in constructed wetlands used for tertiary wastewater treatment[J]. *Ecological Engineering*, 2015, 84: 38-45.
- [24] Deng X Y, Zhang B, Tang H, et al. Analysis of microbial diversity in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by MiSeq high-throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2018, 39(24): 149-155. [邓晓影, 张宾, 汤贺, 等. 基于高通量测序的南美白对虾中微生物群落分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(24): 149-155.]
- [25] Cao Q Q, Wang H, Chen X C, et al. Composition and distribution of microbial communities in natural river wetlands and corresponding constructed wetlands[J]. *Ecological Engineering*, 2017, 98: 40-48.
- [26] Lauber C L, Hamady M, Knight R, et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15): 5111-5120.
- [27] Peralta R M, Ahn C, Gillevet P M. Characterization of soil bacterial community structure and physicochemical properties in created and natural wetlands[J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 443: 725-732.
- [28] Ruiz-Rueda O, Hallin S, Bañeras L. Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland[J]. *FEMS*

- Microbiology Ecology, 2009, 67(2): 308-319.
- [29] Zhang C B, Wang J, Liu W L, et al. Effects of plant diversity on microbial biomass and community metabolic profiles in a full-scale constructed wetland[J]. Ecological Engineering, 2010, 36(1): 62-68.
- [30] Tang X S. The effect of hydraulic loading and operation time on the removal effect in the constructed wetlands for mariculture tail water treatment[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [唐小双. 水力负荷、运行时间对人工湿地处理海水养殖尾水效果的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [31] Zhang K K. Study on purification performance and microbial community characteristics of constructed wetland for mariculture tail water treatment[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [张可可. 人工湿地对海水养殖尾水的净化性能及其微生物群落特征研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [32] Qiao F, Yang Q F, Hou R X, et al. Moderately decreasing fertilizer in fields does not reduce populations of cereal aphids but maximizes fitness of parasitoids[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 2517.
- [33] Li F P, Wei H Y, Ma Z, et al. Research progress of selection of plants for constructed wetlands and effect of plants's purification on sewage[J]. Wetland Science, 2017, 15(6): 849-854. [李峰平, 魏红阳, 马喆, 等. 人工湿地植物的选择及植物净化污水作用研究进展[J]. 湿地科学, 2017, 15(6): 849-854.]
- [34] Li X X, Xie Q L, You S H. The functions and selection of constructed wetland plants and media[J]. Industrial Safety and Environmental Protection, 2008, 34(3): 54-56. [李小霞, 解庆林, 游少鸿. 人工湿地植物和填料的作用与选择[J]. 工业安全与环保, 2008, 34(3): 54-56.]
- [35] Yuan R W, Liu L, Zhang R, et al. The interaction mechanism between plant rhizosphere secretion and soil microbe: A review[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(2): 26-35. [袁仁文, 刘琳, 张蕊, 等. 植物根际分泌物与土壤微生物互作关系的机制研究进展[J]. 中国农学通报, 2020, 36(2): 26-35.]
- [36] Wang F, Duan H L, Liu Y F, et al. Analysis of bacterial community at the rhizosphere and non-rhizosphere of plants in constructed wetland treating brackish eutrophic water[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2020, 14(7): 1844-1851. [王芬, 段洪利, 刘亚飞, 等. 人工湿地处理含盐富营养化水的植物根际与非根际菌群分析[J]. 环境工程学报, 2020, 14(7): 1844-1851.]
- [37] Xia Z G, Liu G C, She Z L, et al. Performance and bacterial communities in unsaturated and saturated zones of a vertical-flow constructed wetland with continuous-feed[J]. Biore-source Technology, 2020, 315: 123859.
- [38] Gao F, Liu G C, She Z L, et al. Effects of salinity on pollutant removal and bacterial community in a partially saturated vertical flow constructed wetland[J]. Bioresource Technology, 2021, 329: 124890.
- [39] Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. The prokaryotes: proteobacteria: alpha and beta subclasses[M]. New York: Springer, 2006: 3-37.
- [40] Ansola G, Arroyo P, Sáenz de Miera L E. Characterisation of the soil bacterial community structure and composition of natural and constructed wetlands[J]. Science of the Total Environment, 2014, 473-474: 63-71.
- [41] Liu J, Yi N K, Wang S, et al. Impact of plant species on spatial distribution of metabolic potential and functional diversity of microbial communities in a constructed wetland treating aquaculture wastewater[J]. Ecological Engineering, 2016, 94: 564-573.
- [42] Li Z L, Ding Y L, Bai S Y, et al. Correlations between substrate structure and microbial community in subsurface flow constructed wetlands[J]. Environmental Science, 2017, 38(9): 3713-3720. [李振灵, 丁彦礼, 白少元, 等. 潜流人工湿地基质结构与微生物群落特征的相关性[J]. 环境科学, 2017, 38(9): 3713-3720.]
- [43] Stottmeister U, Wießner A, Kusch P, et al. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment[J]. Biotechnology Advances, 2003, 22(1-2): 93-117.
- [44] Fan J F, Chen J Y, Chen L G, et al. Research on denitrifying bacteria quantification and diversity in Liaohe Estuary sediments[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2011, 33(3): 94-102. [樊景凤, 陈佳莹, 陈立广, 等. 辽河口沉积物反硝化细菌数量及多样性的研究[J]. 海洋学报(中文版), 2011, 33(3): 94-102.]
- [45] Hoefel D, Monis P T, Grooby W L, et al. Profiling bacterial survival through a water treatment process and subsequent distribution system[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(1): 175-186.
- [46] van Niftrik L, Jetten M S M. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: Unique microorganisms with exceptional properties[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2012, 76(3): 585-596.
- [47] Miao Y, Liao R H, 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.
- [48] Feng G. Estimating the actinobacterial diversity and activity

- potentiality in a coastal wetland of the Yellow River Delta[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013. [冯鸽. 黄河三角洲滨海湿地放线菌多样性及活性潜力评估[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.]
- [49] Li K X, Wu Y H, Wan L, et al. Variation of microbial community in constructed wetland substrate motivated by nano titanium dioxide[J]. Chinese Journal of Ecology, 2020, 39(12): 4068-4077. [李可心, 吴英海, 宛立, 等. 纳米二氧化钛驱动的人工湿地基质微生物群落差异[J]. 生态学杂志, 2020, 39(12): 4068-4077.]
- [50] Ding H J, You J J, Wang D Q, et al. Synergistic effect of hydraulic loading and organic loading on microbial community structure in constructed wetlands[J]. Environmental Pollution and Control, 2020, 42(1): 61-65. [丁海静, 游俊杰, 王敦球, 等. 水力负荷与有机负荷协同作用对人工湿地微生物群落结构的影响[J]. 环境污染与防治, 2020, 42(1): 61-65.]
- [51] Wang B. Purification performance of odorous-black water and its microbial mechanisms in integrated constructed wetland[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2017. [王博. 复合型人工湿地对黑臭水体的净化性能及其微生物学机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017.]
- [52] Pan A, Zhang Z, Sun L, 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. [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.]
- [53] Ibekwe A M, Lyon S R, Leddy M, et al. Impact of plant density and microbial composition on water quality from a free water surface constructed wetland[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(4): 921-936.
- [54] Calheiros C S C, Duque A F, Moura A, et al. Changes in the bacterial community structure in two-stage constructed wetlands with different plants for industrial wastewater treatment[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(13): 3228-3235.
- [55] Truu M, Juhanson J, Truu J. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands[J]. Science of the Total Environment, 2009, 407(13): 3958-3971.
- [56] Zhang X, Cheng M Q, Cheng M Y, et al. Study on the treatment effect of plants in constructed wetland on low salinity culture wastewater[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2021, 30(6): 1024-1033. [张筱, 程梦奇, 程梦雨, 等. 人工湿地中植物对低盐度养殖废水处理效果[J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(6): 1024-1033.]
- [57] Shu D T, He Y L, Yue H, et al. Microbial structures and community functions of anaerobic sludge in six full-scale wastewater treatment plants as revealed by 454 high-throughput pyrosequencing[J]. Bioresource Technology, 2015, 186: 163-172.
- [58] Wang H, Yi P, Zhang S J, et al. Functional microbial community composition analysis in the laboratory-scale stable partial nitrifying-ANAMMOX municipal wastewater reactor[J]. Journal of Graduate University of Chinese Academy of Sciences, 2012, 29(1): 38-46. [王惠, 易鹏, 张树军, 等. 短程硝化-ANAMMOX反应器处理城市污水过程中脱氮微生物的群落解析[J]. 中国科学院研究生院学报, 2012, 29(1): 38-46.]
- [59] Okada N, Nomura N, Nakajima-Kambe T, et al. Characterization of the aerobic denitrification in *Mesorhizobium* sp. strain NH-14 in comparison with that in related rhizobia[J]. Microbes and Environments, 2005, 20(4): 208-215.
- [60] Ji G D, Wang R J, Zhi W, et al. Distribution patterns of denitrification functional genes and microbial floras in multimedia constructed wetlands[J]. Ecological Engineering, 2012, 44: 179-188.
- [61] Xiong J Q, Li S S, Ge Y, et al. Characterization of microbial communities in vertical flow constructed wetland for highly polluted river water treatment[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2017, 11(3): 1959-1965. [熊家晴, 李珊珊, 葛媛, 等. 处理高污染河水垂直流人工湿地微生物群落特性[J]. 环境工程学报, 2017, 11(3): 1959-1965.]
- [62] Panswad T, Anan C. Impact of high chloride wastewater on an anaerobic/anoxic/aerobic process with and without inoculation of chloride acclimated seeds[J]. Water Research, 1999, 33(5): 1165-1172.
- [63] Liu Y F. Performance and denitrifier microbial analysis for vertical flow constructed wetland treating eutrophic brackish water[D]. Tianjin: Tianjin University, 2017. [刘亚飞. 垂直流人工湿地处理含盐富营养化水效果与脱氮菌群分析[D]. 天津: 天津大学, 2017.]

Comparison of microbial community characteristics in plant rhizosphere and other substrates in an integrated vertical flow constructed wetland

ZHAO Kexin^{1,2}, YIN Zhendong¹, ZHANG Keke¹, TANG Xiaoshuang¹, CUI Zhengguo¹, QU Keming¹

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China;
2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University; International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: A constructed wetland combines the functions of the substrate, plants, and microorganisms, such as filtration, adsorption, ion exchange, plant absorption, and microbial degradation, to realize the efficient purification of aquaculture tail water. Such a system has the advantages of simple processes, less investment costs, low energy consumption, high anti-shock load capacity, effective water treatment, and remarkable ecological benefits. However, due to the influence of salinity, such systems are rarely used to treat mariculture tail water. High-throughput sequencing technology provides a rapid and affordable method for sequencing millions of DNA molecules simultaneously and has become an important technique for studying the characteristics of a microbial community. To determine the $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, and TN removal efficiencies in a constructed wetland for the treatment of mariculture tail water and to evaluate the microbial community characteristics in the plant rhizosphere and different substrate layers, we conducted experiments with an integrated vertical flow constructed wetland containing *Spartina alterniflora*, fine sand, coal cinder, and crushed stone. We determined the nitrogen removal efficiency of a vertical flow composite constructed wetland using the tail water of grouper culture. The characteristics of the microbial community in the plant rhizosphere and different substrate layers were determined using high-throughput sequencing. In this experiment, water samples were collected at four locations every day from September to November, and the concentrations of COD, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ and TN were determined using the national standard method. Subsequently, microbial samples were collected from 16 locations and sequenced using high-throughput sequencing technology. The results of water quality analysis show that the average concentrations of COD, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, and TN in the outlet water were 4.00 mg/L, 0.15 mg/L, 0.16 mg/L, 0.04 mg/L, and 0.64 mg/L, respectively, yielding removal rates of 48.98%, 92.10%, 94.49% and 78.36%, respectively. High-throughput sequencing revealed a highly abundant and diverse microbial community in the plant rhizosphere and fine sand layer, in contrast to other substrates. This is because plants in a constructed wetland form an oxidative microenvironment in the reducing medium of the root zone through photosynthesis. The co-existence of aerobic and anaerobic zones provides suitable niches for aerobic, facultative anaerobic, and anaerobic microorganisms in the root zone and promotes the growth and reproduction of microorganisms. Additionally, the contact between the fine sand layer and the plant rhizosphere increases the community richness and diversity of the fine sand layer compared to those in other substrate layers. The predominant microbes were in the phyla Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Chloroflexi, and Firmicutes with relative abundances of 53.7%, 11.5%, 11.9%, 6.4%, and 3.7%, respectively. The predominant microbes were of the classes Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Actinobacteria, and Bacterodia with relative abundance of 30.1%, 20.9%, 11.9%, and 10.3%, respectively. The predominant functional microbes related to nitrogen removal included

those in the genera *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Acinetobacter*. Microbial metabolism function was abundant in the constructed wetland, and all samples had a similar functional composition. Microbial community composition showed little variation within the same substrate layer, indicating that microbial composition remains relatively stable within a consistent environment. The degree of difference between microbial communities in each substrate layer was smaller in the secondary wetland unit than in the primary wetland unit. This is because the majority of tail water purification occurs in the primary wetland, where the change gradient in the concentration of nitrogen, phosphorus, and other pollutants, dissolved oxygen, salinity, and other related factors is greater along the flow direction, resulting in larger changes in the microbial growth environment. Consequently, variation in the microbial community composition is more pronounced. However, the gradient of various influencing factors along the flow direction is smaller in the secondary wetland, and the variation of the microbial growth environment is also limited, resulting in less variation in the microbial community composition in the secondary wetland than in the primary wetland. These results reveal the relationship between nitrogen removal efficiency and microbial community structure. Moreover, they provide a theoretical basis for elucidating the nitrogen removal mechanism of each substrate layer in a constructed wetland, to enable the construction of wetland systems for the efficient treatment of tail water.

Key words: constructed wetland; high-throughput sequencing; microbial community; biological nitrogen removal

Corresponding author: CUI Zhengguo. E-mail: cuizg@ysfri.ac.cn