

复合垂直流人工湿地基质理化性质 对 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化菌多样性的影响

赵伟^{1,2}, 朱四喜^{1,2}, 夏国栋^{1,2}, 高宁^{1,2}, 赵斌³, 王众⁴

(1. 贵州民族大学生态环境工程学院, 贵州 贵阳 550025;

2. 国家民委喀斯特环境地质灾害防治重点实验室, 贵州 贵阳 550025;

3. 贵阳人文科技学院, 贵州 贵阳 550025;

4. 国家海洋局秦皇岛海洋环境监测中心站, 河北 秦皇岛 066000)

摘要: 深入研究复合垂直流人工湿地基质理化性质及其对相关脱氮反硝化微生物的影响, 可为解析人工湿地污水处理及提高脱氮效率提供理论依据。2020年12月采集贵州喀斯特地区复合垂直流人工湿地4口池(一级垂直流下行池、一级垂直流上行池、二级垂直流下行池、二级垂直流上行池)的基质样品, 用Illumina高通量测序技术获得反硝化功能基因序列, 分析其种群组成和多样性特征, 并采用冗余分析揭示反硝化菌群与基质理化性质之间的相关性。结果表明, 复合垂直流人工湿地中4口池的基质理化性质存在显著差异: pH在4口池中均呈中性, 溶解氧(DO)呈先下降后升高趋势, 下行池的基质电导率(EC)均比上行池要高; 总氮(TN)、总磷(TP)含量随着人工湿地梯级呈显著下降趋势, 未出现厌氧现象; NO_3^- -N和 NH_4^+ -N含量在二级垂直流下行池中大量积累并达到峰值。在多样性分析中, *nirS*、*nirK*型反硝化菌丰度随着人工湿地梯级呈先降低后升高的趋势, 多样性随人工湿地级数逐渐降低, 且下行池丰度多样性显著高于上行池。基质中*nirS*型反硝化菌共5门9属, *nirS*型为6门14属, 变形菌门是*nirS*、*nirK*型反硝化菌群的共同优势菌门, 相对丰度为55.36%~65.72%、30.06%~45.66%。*nirS*、*nirK*型反硝化菌共有OTUs数分别为392、245, 并与反硝化菌群OTUs数目趋势一致, 从多角度表明*nirS*型反硝化菌群丰度明显高于*nirK*型, 且共有OTUs占有率高达41.6%和41.7%, 表明各级池中反硝化菌群相似度较高。冗余分析表明基质中*nirS*和*nirK*反硝化菌群的构建主要受pH、 NH_4^+ -N、DO、TP、TN影响, 且*nirS*型对pH、*nirK*型对 NH_4^+ -N的响应更为强烈。

关键词: *nirS*和*nirK*型; 反硝化菌; Illumina高通量测序; 冗余分析; 复合垂直流人工湿地

中图分类号: Q178.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2024)02-0132-09

因人工湿地污水处理系统具有低成本、低功耗、低碳排放的优点, 现已得到广泛应用(Chen et al, 2011)。人工湿地中反硝化微生物多样性是湿地净化污水的一个关键因素, 其净化原理是利用植物、微生物和基质三者的相互作用达到去除污染物的效果(雷旭等, 2015)。复合垂直流人工湿地综合了地表流和潜流湿地系统特征, 水流在基质床中呈上下垂直流动, 具有脱氮效率高且运行稳定的优点, 对场地要求低且不受季节影响还能实现高效净化效果(贺锋等, 2005)。因而, 复合垂直流人工湿地基质理化性质

及相关脱氮反硝化微生物的深入研究, 对于解析复合垂直流人工湿地污水处理机制以及提高脱氮效率具有重要意义。

近几年, 随着高通量测序技术的快速发展, 反硝化菌群研究领域取得了较大进展(Han et al, 2021; Xue et al, 2021), 主要体现在反硝化微生物的筛选、反硝化基因的识别、反硝化微生物群落的演替特征及驱动因素分析和人工湿地生物强化技术(康鹏亮等, 2018; 邵汝英等, 2019; 文刚等, 2020)等方面。研究较多的有*nirS*和*nirK*型微生物, 其多样性结构主要受温度、 NO_3^- -N、溶解氧(DO)和pH等影响, 基质中*nirS*丰度显著高于*nirK*(张盛博等, 2017), 而且*nirS*和*nirK*群落种属丰度和结构因基质理化性质的改变而不同(Li et al, 2019)。同时, *nirS*和*nirK*占据了不同的生态地位, 且随基质理化性质而改变(Yuan et al, 2012)。因此, 人工湿地反硝化菌群多样性特征对脱氮效率的影响是研究关键。

收稿日期: 2022-02-01 修回日期: 2023-08-31

基金项目: 2024年贵州省基础研究(自然科学基金)计划项目(黔科合基础-ZK[2024]一般490); 国家自然科学基金(31560107)。

作者简介: 赵伟, 1999年生, 男, 硕士研究生, 研究方向为环境工程。E-mail: 1621570682@qq.com

通信作者: 朱四喜, 男, 教授。E-mail: zhusixi2011@163.com

在增强人工湿地氮处理能力研究中,黄铁矿(Xu et al,2021)、沸石(Du et al,2020)等特殊基质材料可大大提高脱氮效率,添加外源菌(Wang et al,2021)或耐盐菌剂(Wang et al,2020)等可以定向改变湿地中的反硝化菌群落结构,增强人工湿地对特殊废水的反硝化作用,提高净化效率。然而,人工湿地反硝化菌群落结构丰度及脱氮强化研究主要集中于单一的水平垂直流人工湿地中,该领域针对复合垂直流人工湿地研究较少,尤其是复合垂直流人工湿地处理污水过程中该菌群落变化及其驱动机制鲜见报道。因而,本文基于 Illumina 高通量测序技术识别 *nirS* 和 *nirK* 反硝化菌群,对喀斯特地区复合垂直流人工湿地基质理化性质及其反硝化菌多样性特征进行研究,通过韦恩图和冗余分析(RDA)揭示菌群多样性与环境因子的关系,以期复合垂直流人工湿地高效脱氮提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 基质样品采集

本研究中的复合垂直流人工湿地位于贵州喀斯特地区瓮安县建中镇,其构成如下:农村生活污水经预处理单元(格栅、厌氧池、生物接触氧化池)后,按顺序依次进入一级垂直流下行池(A池)、一级垂直流上行池(B池)、储水渠、二级垂直流下行池(C池)、二级垂直流上行池(D池)、生物稳定塘(图1)。2020年12月对复合垂直流人工湿地中4口池(即一级垂直流下行池、一级垂直流上行池、二级垂直流下行池、二级垂直流上行池)的基质进行样品采集,每个池子采集3个平行样,取其平均值。4口池中的基质原本由土壤、细砂、粗砂和砾石组成,但随着污水的进入、泥沙的沉积和微生物的繁殖使活性污泥大量积累,故所采集的基质成分主要以活性污泥为主。将样品放入便携式冰柜冷藏运输至实验室,手动去除所有根部残留物和砂石后,将样品通过2 mm网筛。每个基质样品分为2份:1份在-80℃下储存用于 Illumina MiSeq 高通量测序;1份等待自然风干,采用《土壤农化分析》(鲍士旦,2008)的方法在室温下分析基质理化性质,使用基质浸提液测定溶解氧(DO)。

1.2 微生物 DNA 提取与 Illumina MiSeq 测序

采用 E.Z.N.A. soil DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.) 提取基质微生物中的 DNA, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳对提取的 DNA 进行检测, 并用 Nano Drop 2000 (U.S.) 测定 DNA 浓度, 保存在 -20℃ 冰箱待用。

采用 Illumina MiSeq 测序技术分析复合垂直流人工湿地反硝化菌群组成与多样性特征, 将样品送至上海美吉生物公司进行高通量测序。

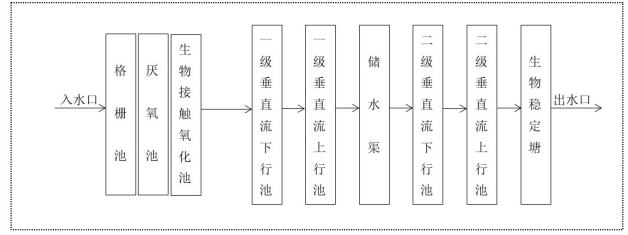


图1 复合垂直流人工湿地流程

Fig.1 Flow chart of the integrated vertical-flow constructed wetland

1.3 统计分析

高通量测序完成后,使用 fastp 软件对反硝化功能基因原始序列进行质控,去除低质量序列。处理得到的优质序列反硝化功能基因通过 QIIME 进行序列长度扩增,再将扩增后的序列数据通过 SRA (Sequence Read Archive) 数据库进行比对。根据分类注释结果对物种组成分类,去除丰度小于 0.001 的数值,在 97% 相似水平下归类为操作分类单元 (OTUs)。然后通过 Mothur 软件对聚类分析结果进行解析,得到 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化菌群多样性指数,进而进行物种组成和结构分析。采用 Excel 进行数据处理,并通过 SPSS 软件中单因素方差分析 (ANOVA) 对基质养分进行解析,采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行图形绘制与分析,利用 Canoco5 软件进行冗余分析 (RDA) 以揭示反硝化菌群落与基质理化性质之间的相关性。

2 结果与分析

2.1 基质理化性质

复合垂直流人工湿地 4 口池的基质理化性质存在显著差异。基质浸提液 DO 随着梯级(即一级垂直流下行池、一级垂直流上行池、二级垂直流下行池、二级垂直流上行池)呈先降低后升高的趋势,变化范围在 26.54~34.08 mg/L,在一级垂直流上行池中 DO 最低,但均未出现厌氧现象(表 1)。基质 pH 变化范围在 7.63~8.09,基本呈中性。下行池的基质电导率 (EC) 均比上行池要高,但在梯级之间没有显著差异。基质 TP 含量呈显著下降趋势, TN 呈先降低后升高的趋势。NO₃⁻-N 和 NH₄⁺-N 呈先升高后降低趋势,且在二级垂直流下行池中达到峰值,氮素转化的中间态在此池中大量积累。综上所述,复合垂直流人工湿地在脱氮处理上效果显著。

表 1 复合垂直流人工湿地基质理化性质

Tab.1 Substrate physical and chemical properties of the integrated vertical-flow constructed wetland

理化指标	一级垂直流下行池	一级垂直流上行池	二级垂直流下行池	二级垂直流上行池
pH	7.63±0.25 ^{ab}	8.09±0.21 ^a	7.68±0.51 ^{ab}	7.82±0.17 ^a
DO/mg·L ⁻¹	34.08±3.80 ^a	26.54±5.59 ^a	29.50±6.09 ^a	32.10±2.84 ^a
EC	191.47±6.77 ^a	169.63±16.20 ^a	197.87±30.46 ^a	179.20±10.58 ^a
NH ₄ ⁺ -N/mg·kg ⁻¹	96.74±6.95 ^a	100.34±20.59 ^a	117.21±67.84 ^a	96.01±44.89 ^a
NO ₃ ⁻ -N/mg·kg ⁻¹	0.11±0.03 ^b	0.15±0.07 ^{bc}	0.18±0.11 ^c	0.05±0.01 ^{ab}
TP/g·kg ⁻¹	0.34±0.29 ^a	0.21±0.01 ^a	0.12±0.07 ^a	0.17±0.07 ^a
TN/g·kg ⁻¹	0.50±0.32 ^a	0.47±0.30 ^a	0.76±0.02 ^a	0.86±0.52 ^a

注:组间不同字母差异显著($P<0.05$),所有处理均有 3 个重复。

Note: Different letters in a same row shows a significant difference ($P<0.05$), with analysis of variance (ANOVA) conducted and owning three replicates with all treatment.

2.2 基质 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化菌多样性指数

从 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化菌的丰富度与多样性指数计算结果看,反硝化菌文库覆盖率均在 99% 以上,表明得到的多样性指数数据有效可靠(表 2)。在各级人工湿地中,OTUs 数目空间尺度上变化较明显,总体呈下降趋势(一级垂直流下行池>二级垂直流下行池>二级垂直流上行池>一级垂直流上行池),且下行池高于上行池。随着人工湿地梯级的变化,多样性指数(Shannon 指数和 Simpson 指数)变化趋势与 OTUs 正好相反,而丰富度指数(Chao1 指数和 faith_pd 指数)变化趋势与 OTUs 结果基本一致。

2.3 基质 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化菌群落组成

nirS 和 *nirK* 型反硝化菌群落门水平的组成见图 2, *nirS* 型群落共获得 5 门, *nirK* 型群落共获得 6 门。两类菌群除未分类菌门(unclassified)外,主要为变形

菌门(Proteobacteria),且各级湿地中 *nirS*、*nirK* 型反硝化菌群落结构具有相似性。本研究中,在 *nirS* 和 *nirK* 型中变形菌门占绝对优势,平均占比分别为 57.38% 和 41.78%,总体呈先上升后下降的趋势,且二者上行池显著高于下行池。

nirS 和 *nirK* 型反硝化菌群落属水平的组成和差异见图 3, *nirS* 型反硝化菌主要归为 9 个属,除未分类菌属(unclassified)外,主要包括红细菌属(*Rhodobacter*)和脱氯单胞菌属(*Dechloromonas*)。在二级垂直流上行池中红细菌属占绝对优势,一级垂直流下行池与其完全相反,占比最低,各级湿地中丰度变化较为明显。一级垂直流上行池、二级垂直流下行池湿地中脱氯单胞菌属占绝对优势,于一级垂直流下行池、二级垂直流上行池湿地占比最低,呈先升高后降低趋势。*nirK* 型反硝化菌主要归为 14 个属,

表 2 复合垂直流人工湿地 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化菌群多样性指数Tab.2 Diversity indices of the *nirS* and *nirK* denitrifying bacteria in the integrated vertical-flow constructed wetland

多样性指数	基因类型	一级垂直流下行池	一级垂直流上行池	二级垂直流下行池	二级垂直流上行池
OTUs	<i>nirS</i>	592.00±30.51 ^a	540.00±19.67 ^a	590.33±78.85 ^a	566.67±57.73 ^a
	<i>nirK</i>	334.67±26.27 ^a	318.67±10.60 ^a	325.33±57.40 ^a	254.67±78.56 ^a
simpson 指数	<i>nirS</i>	0.97±0.01 ^a	0.96±0.01 ^a	0.93±0.07 ^a	0.93±0.05 ^a
	<i>nirK</i>	0.88±0.06 ^a	0.89±0.02 ^a	0.76±0.13 ^a	0.81±0.08 ^a
shannon 指数	<i>nirS</i>	6.73±0.31 ^a	6.31±0.13 ^a	6.04±1.16 ^a	6.01±0.90 ^a
	<i>nirK</i>	4.92±0.42 ^a	4.59±0.45 ^a	4.11±0.84 ^a	3.91±0.55 ^a
faith_pd 指数	<i>nirS</i>	47.99±6.05 ^{ab}	39.06±2.19 ^b	51.65±7.65 ^{ab}	57.25±7.12 ^a
	<i>nirK</i>	47.66±11.12 ^a	49.68±16.22 ^a	53.83±18.72 ^a	40.51±7.77 ^a
chao1 指数	<i>nirS</i>	737.76±33.47 ^a	690.79±17.56 ^a	743.22±82.23 ^a	703.93±70.07 ^a
	<i>nirK</i>	408.35±32.39 ^a	408.73±15.48 ^a	414.20±58.66 ^a	346.04±75.67 ^a
覆盖度/%	<i>nirS</i>	99.66	99.10	99.37	99.53
	<i>nirK</i>	99.08	99.17	99.26	99.39

注:组间不同字母差异显著($P<0.05$),所有处理均有 3 个重复。

Note: Different letters in a same row shows a significant difference ($P<0.05$), with analysis of variance (ANOVA) conducted and owning three replicates with all treatment.

除未分类菌属外,主要包括红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、氏菌属(*Bosea*)等。红假单胞菌属在一级垂直流上行池湿地中占绝对优势,于二级垂直流上行池湿地占比最低,且一级垂直流上行池湿地丰度较一级垂直流下行池、二级垂直流下行池湿地有显著升高;慢生根瘤菌属在一级垂直流下行池湿地中最占优势,随级数增加丰度逐渐降低;氏菌属随级数的增加也呈持续下降的趋势。此外,各级上下行池中反硝化菌群结构存在显著差异。在各级湿地基质 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化菌群中分别发现了硫杆菌属(*Thiobacillus*)、产黄杆菌属(*Rhodanobacter*)、厌氧绳菌属(*Anaerolinea*)和 *Starkeya* 属、红细

菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)。然而, *nirS*、*nirK* 型反硝化菌群未分类菌属占比较高,可能具有反硝化功能,需进一步研究。

各级湿地中 OTUs 数目组成关系见图 4,在 *nirS*、*nirK* 型反硝化菌中,特有 OTUs 数最多的分别为一级垂直流下行池湿地和二级垂直流下行池湿地(55 和 63 个),同时, *nirS* 型中共有 OTUs 数(392 个)明显高于 *nirK* 型(245 个),与表 2 复合垂直流人工湿地 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化菌群 OTUs 数目趋势一致。以上结果表明,各级湿地之间反硝化菌群相似度较高,且 *nirS* 型反硝化菌群丰度显著高于 *nirK* 型。

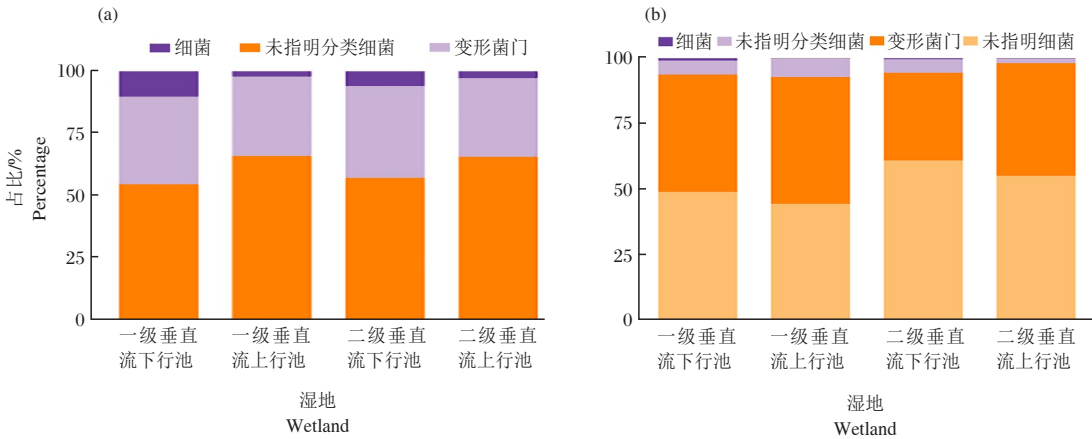
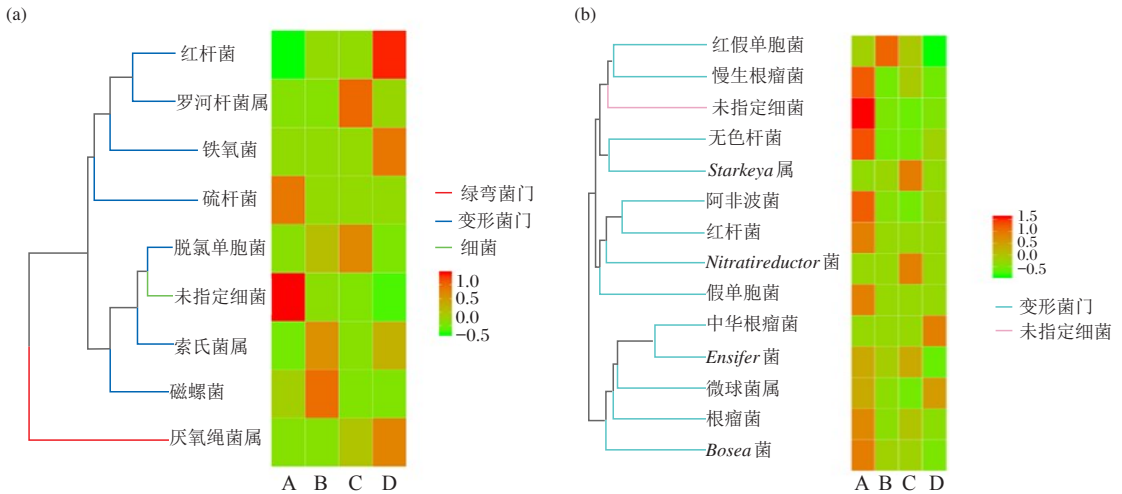


图 2 *nirS*(a) 和 *nirK*(b) 型反硝化菌群落门水平结构组成

Fig.2 Horizontal composition of the *nirS* (a) and *nirK* (b) denitrifying community at the phylum level in the integrated vertical-flow constructed wetland

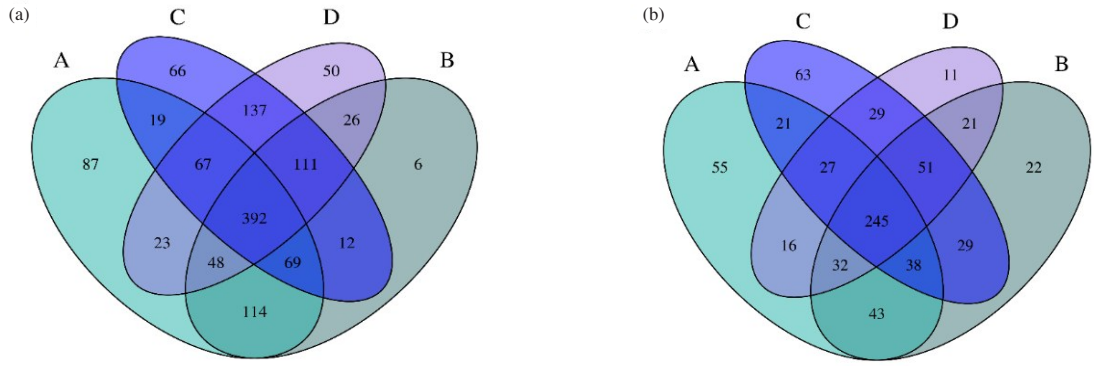


A:一级垂直流下行池;B:一级垂直流上行池;C:二级垂直流下行池;D:二级垂直流上行池

图 3 基于 *nirS*(a) 和 *nirK*(b) 型反硝化菌构建的系统进化树及组间丰度分布

A, B, C, and D are the first-level vertical flow descending tank, the first-level vertical flow ascending tank, the second-level vertical flow descending tank, and the second-level vertical flow ascending tank.

Fig.3 Phylogenetic tree based on denitrifying bacteria *nirS* (a) and *nirK* (b) and the heat map of abundance distribution among groups



A:一级垂直流下行池;B:一级垂直流上行池;C:二级垂直流下行池;D:二级垂直流上行池

图4 *nirS*(a)和*nirK*(b)型反硝化菌在各级湿地中OTUs数目组成

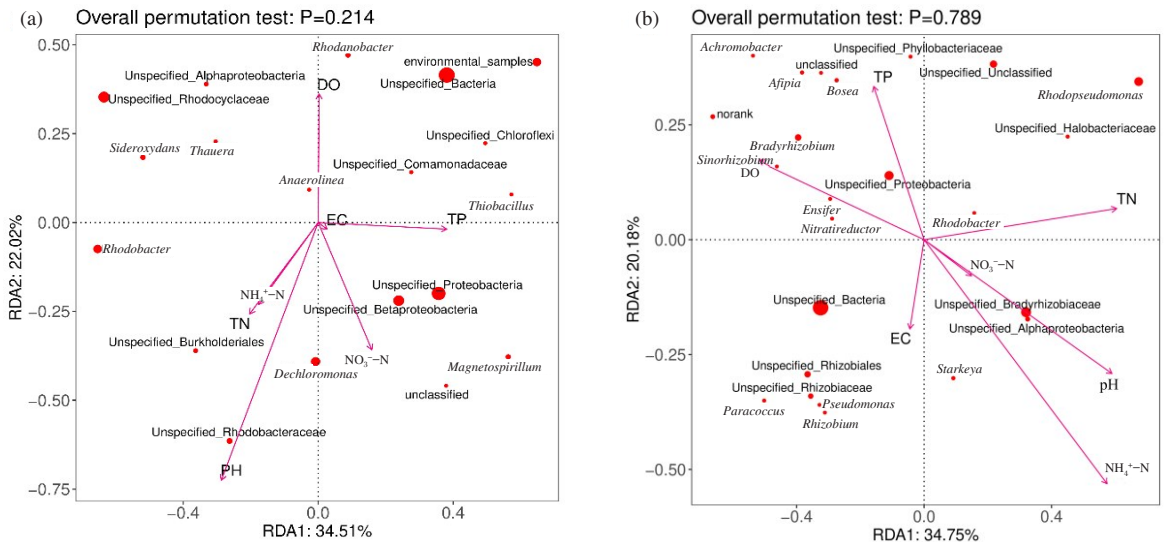
A, B, C, and D represent the first-level vertical flow descending pool, the first-level vertical flow ascending pool, the second-level vertical flow descending pool, and the second-level vertical flow ascending pool, respectively.

Fig.4 Wayne figure based on denitrification bacteria *nirS* (a) and *nirK* (b)

2.4 基质反硝化菌与理化性质的关系

RDA分析表明,前两主轴对复合垂直流人工湿地 *nirS* 和 *nirK* 型反硝化菌群落总变异系数的解释率分别为 56.53%、54.93%,第 1 个 RDA 维度对结构变化的解释率分别为 34.51%、34.75%,第 2 个的解释率分别为 22.02%、20.18%(图 5)。从图 5 可知 DO、pH 是驱动 *nirS* 型反硝化菌群演替的主要环境因子,其次是 TP、TN、NO₃⁻-N 和 NH₄⁺-N 等。此外,脱氮单胞菌属与 TN、NO₃⁻-N、NH₄⁺-N 和 pH 呈正相关,与 DO 呈显著负相关;TP 是红细菌属的主要影响因子;磁螺菌属与 NO₃⁻-N 和 TP 呈正相关,与 DO 和 pH 呈负相关。湿地基质中

TP、TN、NH₄⁺-N、DO、pH 是驱动 *nirK* 型反硝化菌群演替的主要环境因子,其次是 NO₃⁻-N、EC 等。此外,氏菌属和慢生根瘤菌属与 DO、TP 呈显著正相关,与 pH、NH₄⁺-N 呈显著负相关,且两属之间种群结构相似度较高;TN 是红假单胞菌属主要影响因子,二者反硝化种群结构受 pH、DO 的显著影响,其中 *nirS* 型关键菌属多为严格厌氧型细菌群落, *nirK* 型菌属群落多为兼性厌氧型,二者对氧的敏感程度不同,且 *nirK* 型对有机物 N、P 的变化更为敏感,其中, *nirK* 型反硝化菌丰度与 pH 虽存在显著相关关系,但携带 *nirS* 的反硝化菌比携带 *nirK* 的反硝化菌对土壤 pH 更为敏感。



Rhodobacter: 红细菌属; *Thiobacillus*: 硫杆菌属; *Rhodanobacter*: 罗河杆菌属; *Magnetospirillum*: 磁螺菌; *Dechloromonas*: 脱氮单胞菌; *Rhodopseudomonas*: 红假单胞菌; *Achromobacter*: 无色杆菌; *Bradyrhizobium*: 慢生根瘤菌; *Pseudomonas*: 假单胞菌; *Paracoccus*: 微球菌; *Rhizobium*: 根瘤菌

图 5 复合垂直流人工湿地 *nirS* (a) 和 *nirK* (b) 反硝化种群 RDA 分析

Fig. 5 Redundancy analysis of denitrification bacteria *nirS* (a) and *nirK* (b) populations in the integrated vertical-flow constructed wetland

由图6可知, *nirS* 型反硝化菌群中磁螺菌属与 NO_3^- -N 呈正相关。 *nirK* 型反硝化菌群中, NH_4^+ -N、 NO_3^- -N 是根瘤菌属的主要影响因子,且 EC 与根瘤菌属呈显著正相关。

3 讨论

3.1 基质理化性质随湿地梯级的变化

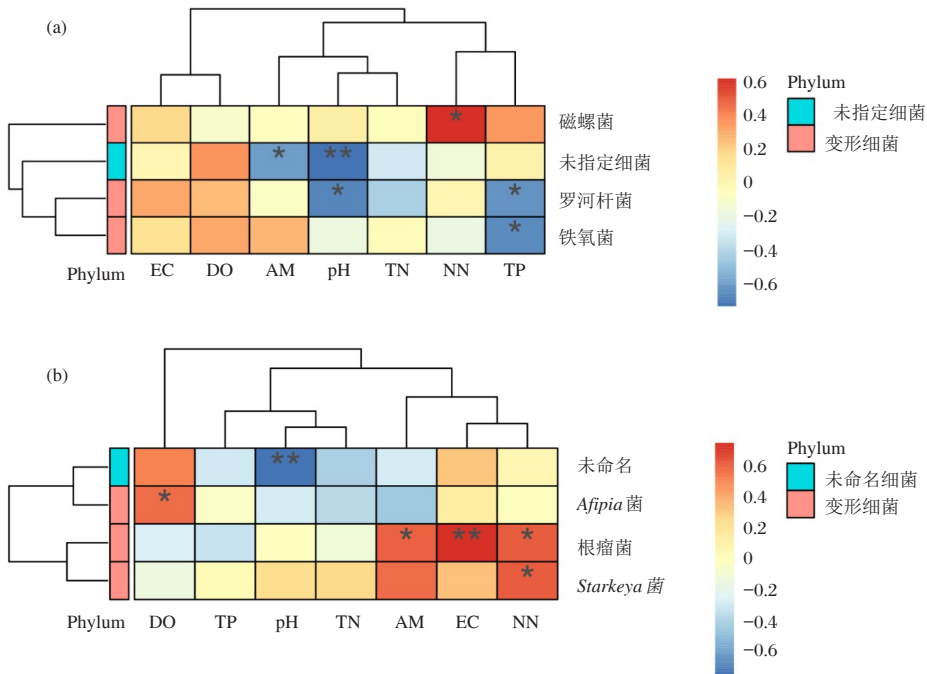
本研究表明,有机物进入湿地后,因前置硝化作用中微生物是好氧生物,消耗湿地中大量氧气,进入厌氧反硝化过程后,水中溶氧慢慢恢复上升,从而导致 DO 随湿地空间变化先下降后升高(王爱平等,2010)。反硝化菌对有机物转化利用,使得 TN、TP 含量随着人工湿地梯级呈显著下降趋势,有机氮在反硝化菌作用下转化为氮素中间产物(赵斌等,2019),引起 pH、 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 含量升高,最后还原成 N_2 释放,并且释放出 H^+ ,导致湿地各池基质 pH 先升高后降低。因水流作用方向不同,下行池中带电离子更容易在基质层附着,导致其电导率 EC 均比上行池要高(贺锋等,2005)。

3.2 基质 *nirS* 和 *nirK* 菌群的识别

根据高通量测序结果对 OTU 进行注释,对基质 *nirS*、*nirK* 型反硝化菌门属水平下细菌进行分析。从图2、3中可知, *nirS* 型反硝化菌鉴定为5门9属, *nirK*

型鉴定为6门14属,变形菌门是 *nirS*、*nirK* 型反硝化菌群的共同优势菌门。 *nirS* 型主要含红细菌属、脱氮单胞菌属和磁螺菌属等; *nirK* 型主要含红假单胞菌属、慢生根瘤菌属和氏菌属等,二者优势菌属多属于变形菌门。红假单胞菌属(杨文焕等,2020)、红细菌属(杨浩等,2017)是典型的反硝化脱氮细菌,其余菌属占比虽然不高,对反硝化脱氮也发挥着不可替代的作用(Hou et al,2018),但其驱动机制需进一步分析。

韦恩图(图4)可以非常直观地看出各级湿地中 OTUs 数目组成的相似性和独特性情况,本研究表明 *nirS* 型反硝化菌共有 OTUs 数目(392个)显著高于 *nirK* 型的数目(245个),与反硝化菌群 OTUs 数目(表2)趋势一致,证明其 *nirS* 的丰度显著高于 *nirK* 型反硝化菌,并且张敏等(2015)在对人工湿地反硝化菌群功能基因丰度研究中,从多角度证明其 *nirS* 的丰度显著高于 *nirK* 型,从侧面表明湿地中反硝化菌群主要以 *nirS* 型群落为主。且在 *nirS*、*nirK* 型反硝化菌中,特有 OTUs 占有比重最高的分别为一级垂直流下行池湿地和二级垂直流下行池湿地,占有率高达 41.6% 和 41.7%,显著高于其他几级湿地,这可能是因为复合垂直流人工湿地梯级变化对菌属的筛选作用,使得一级下行池和二级下行池中特有 OTUs 占比显著高于其他几级湿地。



AM 为 NH_4^+ -N, NN 为 NO_3^- -N。

图6 复合垂直流人工湿地 *nirS* (a) 和 *nirK* (b) 型反硝化菌群与基质理化因子的相关性

AM is NH_4^+ -N, and NN is NO_3^- -N.

Fig. 6 Heat map showing the correlation between *nirS* (a) and *nirK* (b) denitrifying bacteria and the substrate physical and chemical properties in the integrated vertical-flow constructed wetland

3.3 基质理化性质对反硝化菌的影响

反硝化菌群演替的驱动因子主要包括 pH、DO、氮类营养盐 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$) 等 (周石磊, 2017)。张成龙等 (2019) 发现 pH 是变形菌门变化的首要驱动因子, 本研究也证明了此现象, 随 pH 的增加, *nirS*、*nirK* 变形菌门的优势作用增强 (表 1、图 2), 其中 RDA 也显示了 pH 对脱氮单胞菌属和红假单胞菌属、慢生根瘤菌属、氏菌属的重要影响 (图 5), 同样的现象在明红霞等 (2020) 的研究中得到证实, 但该文也指出, *nirK* 型反硝化菌还存在于更广泛的细菌分类中, 包括以放线菌门、厚壁菌门等为主的类群。环境中也可能存在着更高丰度的反硝化菌和更丰富的群落多样性。

DO 主要通过 3 个方面影响反硝化菌的脱氮: (1) 和硝酸盐竞争电子; (2) 抑制反硝化过程酶的合成; (3) 抑制硝酸盐的还原 (Hu et al, 2021)。本研究在 RDA 分析中证实了 DO 与红细菌属呈现高的相关性 (图 5-a); 且 RDA 分析也显示人工湿地 TN 主要来源于 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$, 其为反硝化菌属代谢生长提供了氮类营养盐, 如 *nirS* 中脱氮单胞菌属随湿地空间变化呈升高趋势, 其与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 变化趋势一致 (表 1), 呈现正相关 (图 5-a); *nirK* 中红假单胞菌属、慢生根瘤菌属和氏菌属, 随湿地空间变化呈降低趋势, 其与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 变化趋势 (表 1) 相反, 呈负相关 (图 5-b)。以上结果与钊珍芳 (2019)、陈泽斌等 (2021)、梁伟光等 (2022) 对反硝化菌群结构的研究结果相一致。鲍林林等 (2016) 研究发现北运河沉积物中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 是反硝化群落演替的主要影响因子; Zhou 等 (2019) 通过对反硝化菌群影响因素的研究, 发现 DO 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 是脱氮细菌组成的重要影响因素。氧通过为反硝化菌群提供更高效率的电子受体而抑制反硝化活性, 但随硝化过程 DO 的大量消耗, 达到反硝化菌群最适繁殖条件, 其丰度显著上升, 随 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的进入, 反硝化菌群落从应激到稳定状态, 快速响应氮素变化, 从而达到动态平衡。

综上, 复合垂直流各级人工湿地反硝化菌群有明显差异, 菌群演替特征与 pH、DO 和氮类营养盐等因素紧密相关。本研究仅讨论了已识别功能菌属与环境因子的重要关系, 尚有诸多未分类菌属功能有待研究, 进一步研究可能为解析复合垂直流人工湿地氮素变化和丰富 *nirS*、*nirK* 型反硝化研究提供重要思路。

4 结论

(1) 复合垂直流人工湿地基质理化性质中, DO 总体在 26.54~34.08 mg/L, 未出现厌氧现象, pH 在 7.63~8.09, 湿地基质基本呈中性, 转化过程中间态 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 在二级垂直流下行池中大量积累, TN 的含量最终呈明显降低趋势。*nirS* 型反硝化菌群丰度明显高于 *nirK* 型, 且各自在不同级人工湿地中反硝化菌群相似度较高。

(2) 通过高通量测序, *nirS* 型鉴定为 5 门 9 属, *nirK* 型鉴定为 6 门 14 属, 变形菌门是 *nirS*、*nirK* 型反硝化菌群的共同优势菌门。*nirS* 型主要含红细菌属和脱氮单胞菌属等, 菌群多样性及丰度呈时空变化, 即随湿地级数升高, 丰度呈升高趋势, 且下行池显著高于上行池; *nirK* 型主要含红假单胞菌属、慢生根瘤菌属和氏菌属等, 与 *nirS* 型菌群变化趋势完全相反, 菌群多样性及丰度的时空变化随级数升高, 丰度呈降低趋势。二者优势菌属都多隶属于变形菌门。

(3) 对于 *nirS* 型, DO、pH 是反硝化菌群结构和多样性塑造的主要驱动因子, 反硝化菌群多样性和脱氮单胞菌属的空间变化主要受 DO 影响, 红细菌属空间变化主要受 TP 影响; 对于 *nirK* 型, TP、TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、DO、pH 是反硝化菌属结构和多样性塑造的主要驱动因子, 氏菌属的空间变化主要受 DO、TP 影响, 红假单胞菌属空间变化主要受 TN 影响, 其中 *nirS* 型关键菌属多为严格厌氧型细菌群落, *nirK* 型菌属群落多为兼性厌氧型, 对有机物 N、P 的变化更为敏感, 且携带 *nirS* 型的反硝化菌比携带 *nirK* 型的反硝化菌对土壤 pH 更为敏感。

参考文献

- 鲍林林, 王晓燕, 陈永娟, 等, 2016. 北运河沉积物中主要脱氮功能微生物的群落特征 [J]. 中国环境科学, 36(5): 1520-1529.
- 鲍士旦, 2008. 土壤农化分析 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社: 50-56.
- 陈泽斌, 李冰, 林丽, 等, 2021. *nirS* 和 *nirK* 型反硝化细菌在水稻根中的分布 [J]. 东北农业科学, 46(1): 62-67.
- 贺锋, 吴振斌, 陶菁, 等, 2005. 复合垂直流人工湿地污水处理系统硝化与反硝化作用 [J]. 环境科学, (1): 47-50.
- 康鹏亮, 陈胜男, 黄廷林, 等, 2018. 好/厌氧条件下反硝化细菌脱氮特性与功能基因 [J]. 环境科学, 39(8): 3789-3796.
- 雷旭, 李冰, 李晓, 等, 2015. 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, 34(5): 1373-1381.

- 梁伟光,黄廷林,张海涵,等,2022. 李家河水库春季分层期 *nirS* 型反硝化菌群特征分析[J]. 环境科学,43(1):306-313.
- 明红霞,陈泉睿,史银银,等,2020. 辽河口沉积物反硝化过程研究:以反硝化功能基因丰度及 *nirK* 型细菌群落结构分析为例[J]. 海洋学报,42(12):82-92.
- 邵汝英,蔡凯,王镜,等,2019. 高效脱氮菌的分离、鉴定及功能分析[J]. 环境保护科学,45(5):58-62.
- 王爱平,金秋,吴琦平,2010. 人工湿地硝化与反硝化细菌分布研究[J]. 环境科技,23(1):1-4.
- 文刚,王彤,黄廷林,等,2020. 贫营养好氧反硝化菌株的脱氮特性及氮/碳平衡分析[J]. 环境科学,41(5):2339-2348.
- 杨浩,张国珍,杨晓妮,等,2017. 16s rRNA 高通量测序研究集雨窖水中微生物群落结构及多样性[J]. 环境科学,38(4):1704-1716.
- 杨文焕,石大钧,张元,等,2020. 高原湖泊沉积物中反硝化微生物的群落特征:以包头南海湖为例[J]. 中国环境科学,40(1):431-438.
- 张成龙,李冰,侯谄然,等,2019. 复合垂直潜流人工湿地中硝化和反硝化细菌的筛选及其特性分析[J]. 南方农业学报,50(4):736-744.
- 张敏,陶然,杨扬,等,2015. 环境因素对不同工艺人工湿地反硝化功能基因丰度影响[J]. 环境工程学报,9(6):2645-2652.
- 张盛博,何小娟,吴海露,等,2017. 环境因子对人工湿地沉积物中反硝化微生物群落结构的影响[J]. 水处理技术,43(4):11-14,18.
- 钊珍芳,2019. *nirS* 型反硝化菌群结构与脱氮特性研究[D]. 西安:西安建筑科技大学:25-26.
- 赵斌,朱四喜,程谊,等,2019. 贵州草海地区不同土地利用方式土壤中尿素氮转化对3种硝化抑制剂的响应[J]. 西北农业学报,28(7):1169-1178.
- 周石磊,2017. 混合充氧强化水源水库贫营养好氧反硝化菌的脱氮特性及技术应用研究[D]. 西安:西安建筑科技大学.
- Chen G Q, Shao L, Chen Z M, et al, 2011. Low-carbon assessment for ecological wastewater treatment by a constructed wetland in Beijing[J]. Ecological Engineering, 37: 622-628.
- Du L, Zhao Y Q, Wang C, et al, 2020. Effects of plant on denitrification pathways in integrated vertical-flow constructed wetland treating swine wastewater[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 201:110752.
- Han X K, Wang F W, Zhang D J, et al, 2021. Nitrate-assisted biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water-level-fluctuation zone of the three Gorges Reservoir, China: Insights from in situ microbial interaction analyses and a microcosmic experiment[J]. Environmental Pollution, 268:1-12.
- Hou L F, Zhou H X, Wu Q P, et al, 2018. Spatiotemporal changes in bacterial community and microbial activity in a full-scale drinking water treatment plant[J]. Science of the Total Environment, 625:449-459.
- Hu B, Quan J N, Huang K, et al, 2021. Effect of C/N ratio and dissolved oxygen on aerobic denitrification process: a mathematical modeling study[J]. Chemosphere, 272:1-11.
- Li L F, Zheng Z Z, Wang W J, et al, 2019. Terrestrial N₂O emissions and related functional genes under climate change: a global meta-analysis[J]. Global Change Biology, 26(2):931-941.
- Wang X Y, Zhu H, Yana B X, et al, 2020. Bioaugmented constructed wetlands for denitrification of saline wastewater: A boost for both microorganisms and plants [J]. Environment International, 138:105628.
- Wang X Y, Zhu H, Yana B X, et al, 2021. Improving denitrification efficiency in constructed wetlands integrated with immobilized bacteria under high saline conditions[J]. Environmental Pollution, 287:117592.
- Xu Z S, Qiao W W, Song X S, et al, 2021. Pathways regulating the enhanced nitrogen removal in a pyrite based vertical-flow constructed wetland[J]. Bioresource Technology, 325:124705.
- Xue J L, Shi K, Chen C, et al, 2021. Evaluation of response of dynamics change in bioaugmentation process in diesel-polluted seawater via high-throughput sequencing: Degradation characteristic, community structure, functional genes[J]. Journal of Hazardous Materials, 403:1-8.
- Yuan Q, Liu P, Lu Y, 2012. Differential responses of *nirK*- and *nirS*-carrying bacteria to denitrifying conditions in the anoxic rice field soil[J]. Environmental Microbiology Rep, 4(1):113-122.
- Zhou S L, Zhang Y R, Huang T L, et al, 2019. Microbial aerobic denitrification dominates nitrogen losses from reservoir ecosystem in the spring of Zhoucun reservoir[J]. Science of the Total Environment, 651(P1):998-1010.

(责任编辑 熊美华)

Effects of Substrate Physical and Chemical Properties on the Diversity of *nirS* and *nirK* Denitrifying Bacteria in an Integrated Vertical-Flow Constructed Wetland

ZHAO Wei^{1,2}, ZHU Si-xi^{1,2}, XIA Guo-dong^{1,2}, GAO Ning^{1,2}, ZHAO Bin³, WANG Zhong⁴

- (1. College of Eco-environment Engineering, Guizhou Minzu University; Guiyang 550025, P. R. China;
2. The Karst Environmental Geological Hazard Prevention Key Laboratory of State Ethnic Affairs Commission, Guiyang 550025, P. R. China;
3. College of Humanities and Science of Guiyang, Guiyang 550025, P. R. China;
4. Qinhuangdao Marine Environmental Monitoring Center Station of The State Oceanic Administration, Qinhuangdao 066000, P. R. China)

Abstract: In this study, we explored the effects of substrate physical and chemical properties on the community diversity of *nirS* and *nirK* denitrifying bacteria in an integrated vertical-flow constructed wetland in the karst area of south China. In December 2020, substrate samples were collected in four pools (the first-level vertical flow descending pool, the first-level vertical flow ascending pool, the second-level vertical flow descending pool, and the second-level vertical flow ascending pool) of the integrated vertical-flow constructed wetland, and the sequences of the *nirS* and *nirK* denitrifying functional bacteria were obtained by Illumina Qualcomm sequencing technique for species composition and community diversity analysis. The relationship between the denitrifying bacteria and the substrate physical and chemical properties was analyzed by redundancy analysis. Results show that there were significant differences in substrate physical and chemical properties of the four pools. Among them, pH was neutral in all four ponds, DO decreased initially and then increased, and substrate conductivity (EC) of the descending pool was higher than that of the ascending pool. The contents of TN and TP decreased significantly while cascading through the constructed wetlands, and there was no anaerobic activity. The contents of NO_3^- -N and NH_4^+ -N accumulated and peaked in the secondary vertical flow descending pool. The abundance of *nirS* and *nirK* denitrifying bacteria decreased initially and then increased in the four cascaded pools, while community diversity of the denitrifying bacteria gradually decreased. Diversity in the descending pools was significantly higher than in the ascending pools. The *nirS* and *nirK* denitrifying bacteria identified in the substrate included, respectively, 9 genera and 5 phyla, and 14 genera and 6 phyla. *Proteus* was the common dominant phylum of *nirS* and *nirK* denitrifying bacteria, with a relative abundance of 55.36%–65.72%, 30.06%–45.66%, respectively. The dominant bacteria genera were *Rhodobacter*, *Dechloromonas*, *Rhodopseudomonas*, *Bradyrhizobium* and *Bosea*. The Wayne diagram shows that the common OTUs of *nirS* and *nirK* denitrifying bacteria were 392 (41.6%) and 245 (41.7%), respectively, consistent with the total OTU composition of the denitrifying bacteria, and the abundance of denitrifying bacteria of *nirS* was significantly higher than *nirK*, indicating that the similarity of denitrifying bacteria in all levels of pools was high. Redundancy analysis shows that the construction of *nirS* and *nirK* denitrifying bacteria in the substrate was primarily affected by pH, DO, TP, TN, NH_4^+ -N, and the responses of *nirS* to pH and *nirK* to NH_4^+ -N were stronger. Our study provides a theoretical basis for efficient nitrogen removal in integrated vertical flow constructed wetlands.

Key words: *nirS* and *nirK* types; denitrifying bacteria; Illumina high-throughput sequencing; redundancy analysis; the integrated vertical-flow constructed wetland