

海水人工湿地脱氮效果与系统内基质酶、微生物分析*

周强^{1,2} 崔正国² 王加鹏^{1,2} 曲克明^{2①} 马绍赛² 毛成全³

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 海阳市黄海水产有限公司 烟台 265122)

摘要 利用人工湿地系统探讨了海水养殖外排水中不同形态氮的去除效果,分析了系统内部微生物空间分布、基质酶活性对氮去除效率的影响,深入研究了系统内部各微生物间相互作用、基质酶活性与微生物空间分布关系。选择互花米草为人工湿地植物,种植密度为64株/m²;基质填料选择细纱、高炉矿渣和珊瑚石。在3种不同工况条件下,研究人工湿地系统中氮的去除效果、微生物数量和基质酶活性。结果显示,系统对TN、NH₄-N平均去除率分别为(25.02±12.69)%、(82.91±17.51)%;系统中不同基质层次的微生物数量和脲酶、脱氢酶活性不同,基质中、上层好氧微生物数量和脲酶、脱氢酶活性显著大于下层,系统下行池中、上层硝化细菌、亚硝化细菌显著高于下层,中、上层反硝化细菌数量明显低于下层;细菌总数与TN($R^2=0.50$)和NH₄-N($R^2=0.61$)去除率存在一定正相关性,基质脲酶与TN去除率存在显著正相关性($R^2=0.86$)。研究结果将有助于理解海水人工湿地处理系统中氮的迁移转化机制。

关键词 人工湿地; 脱氮; 去除率; 酶活性; 微生物

中图分类号 X714 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0010-08

人工湿地系统净化污水主要是通过植物、微生物、基质间发生一系列的物理、化学及生化反应,达到净化废水的目的(Hammer, 1988; 王加鹏等, 2014)。多数学者认为,湿地系统中微生物对污水净化起着决定作用(Smith, 1997; Greenway, 1997; Pinney *et al.*, 2000)。湿地系统内部微生物数量的空间分布会直接影响着整个系统对养殖废水的去除效果,不同微生物菌落集聚于不同空间,形成了相互交错的微生态环境“小室”,在净化养殖废水的作业区内扮演着重要的角色(Correa-Galeote *et al.*, 2013)。基质酶作为一种生物催化剂,来源于系统内部微生物、动物以及植物根系,其功能是加速系统中有机物的化学反应,从而有助于提高湿地系统净化功能(梁威等, 2003; 李智等, 2005),还有研究表明,基质酶的存在有效提高了人

工湿地处理系统对养殖外排水NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N、TN的去除率(Kadlec *et al.*, 1996; Kir, 2001; Schmidt, 2003)。目前,国内外学者对于淡水人工湿地水处理系统中基质酶活性和微生物空间分布的研究较多(岳春雷等, 2004; Schmidt *et al.*, 2003; Stottmeister *et al.*, 2003; Fleming *et al.*, 2002; Menon *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2011),而对于海水人工湿地系统净化养殖外排水中酶活性和微生物空间特征的研究相对较少。本研究利用人工湿地净化海水养殖外排水的实验,测定了人工湿地系统内不同层次的基质酶活性和微生物数量,并结合氮的去除率,探讨了人工湿地系统脱氮效果与基质微生物、酶活性分布的关系,以期为深入研究海水养殖外排水人工湿地处理系统的脱氮机理奠定理论依据。

* 国家自然科学基金青年基金(31101906)和国家科技支撑计划课题(2011BAD13B04)共同资助。周强, E-mail: zhouqiang15849584841@126.com

① 通讯作者: 曲克明, 研究员, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-02-18, 收修改稿日期: 2014-03-20

1 材料与方法

1.1 人工湿地系统构建

在实验室构建小型人工湿地模拟系统(图 1-a)。人工湿地长 0.6 m、宽 0.4 m、高 0.7 m。系统由上、下行池组成,下行池填充基质 0.5 m,由下到上依次是粗珊瑚石、炉渣、细砂,上行池填充基质 0.4 m,填充基质类型与下行池相同,系统底部均设排污系统。系统内耐盐植物采自山东省烟台市海阳滩涂互花米草,其生长盐度为 26–33,种植密度为 64 株/m²。

1.2 设计与方法

海水养殖外排水由饵料和海水配制而成,根据实验需要添加适量 3.83 mg/L NH₄Cl、0.43 mg/L KH₂PO₄ 和 0.5 g/L 葡萄糖。其进水水质,温度为 25–31℃,pH 为 7.4–8.5,盐度为 29–33,溶解氧为 1.5–5.5 mg/L, NH₄-N 浓度范围为 0.30–0.40 mg/L, TN 1.4–2.5 mg/L, 悬浮物为 6–12 mg/L, 浊度为 0.06–0.12。养殖外排水采用循环水处理方式,运行周期为 9–10 d,达到预期效果后,再重新注入养殖外排水循环处理。系统稳定运行 60 d 后,设置 3 个水力停留时间分别为 16 h(工况 1)、24 h(工况 2)、36 h(工况 3)。每天监测出水口 NH₄-N、NO₂-N 和 NO₃-N 的浓度变化情况,pH、温度、溶氧、盐度等采用美国 YSI 多参数分析仪测定。NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N、TN 等指标的测定依据《海洋监测规范》(GB12763 4-2007);NH₄-N 采用纳氏试剂分光光度法,NO₃-N 采用锌镉还原法,NO₂-N 采用乙二胺分光光度法,TN 采用过硫酸钾氧化法,悬浮物采用重量法,浊度采用分光光度法。其数据采用软件 SPSS 10 进行方差分析,用软件 Origin 8 作图。

基质样品采集设置上、下行池 3 层 6 个采样点(图 1-b),样品采集后混合,以备测定。基质附着微生物测定选取与系统脱氮反应有关测定方法按参考文献(许光辉等,1986)进行。基质脲酶的测定采用苯酚钠-次氯酸钠比色法测定,脱氢酶采用 TTC 紫外分光光度法测定(赵连梅等,2009),微生物数量采用稀释平板计数法,细菌采用 2216E 培养基(苗婷婷等,2012)培养周期为 7 d。

2 结果与分析

2.1 人工湿地脱氮效果与影响因素分析

2.1.1 脱氮效果 人工湿地系统中 NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N 和 TN 的变化情况,如图 2、图 3 所示。人工湿地对 NH₄-N 具有良好的去除效果,在一个运行周期内(9–10 d),循环水处理系统内的 NH₄-N 浓度总体呈下降趋势。NH₄-N 的进水浓度为 0.30–0.40 mg/L,当系统处理 2 d 后,试验中 NH₄-N 的浓度基本上降低到 0.10 mg/L 以下,去除率在 70% 以上;循环到第 4 天时,NH₄-N 浓度降到 0.05 mg/L 以下,去除率超过 80%;至第 9、10 天,NH₄-N 平均去除率为(92.63±4.29)%,最高达到 98.27%。随着水力停留时间的增加,NH₄-N 的去除率不断增加。水力停留时间为 16、24、36 h 条件下,NH₄-N 的平均去除率分别为(79.40±5.49)%、(82.44±2.63)%、(87.84±1.81)%。系统对 TN 的去除效果稍差,至第 8 天左右,TN 平均去除率为(31.83±10.08)%,最高达到 53.91%。系统内 TN 有时会出现浓度升高的情况,这可能与 TN 的累积、植物和微生物的新陈代谢等因素有关。水力停留时间为 16、24、36 h 条件下,循环周期结束时,TN 的平均去除率分别为(38.42±12.64)%、(25.97±1.30)%、(26.22±9.37)%。

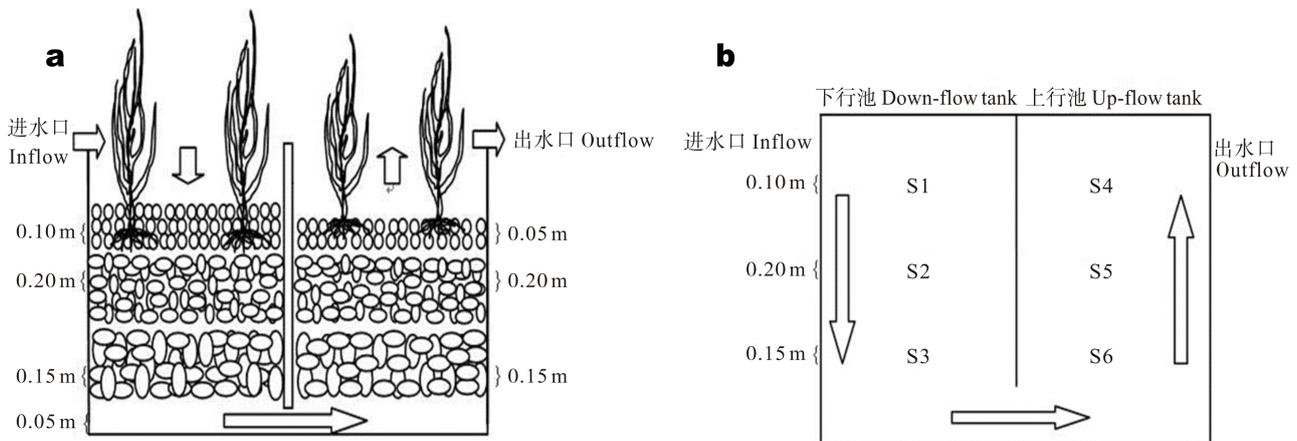


图 1 人工湿地处理系统

Fig.1 The constructed wetland treatment system

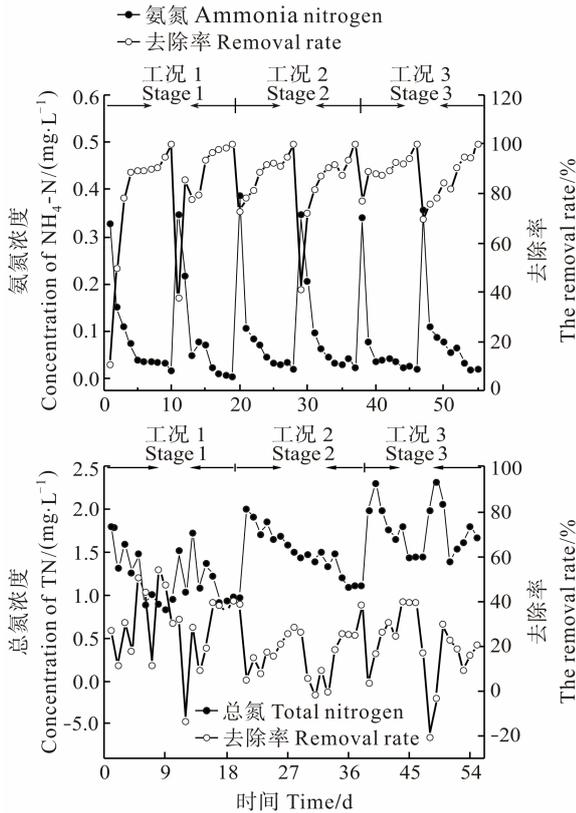


图2 海水人工湿地系统中 NH₄-N、TN 变化情况
Fig.2 The variation of ammonia nitrogen and total nitrogen in the constructed wetland

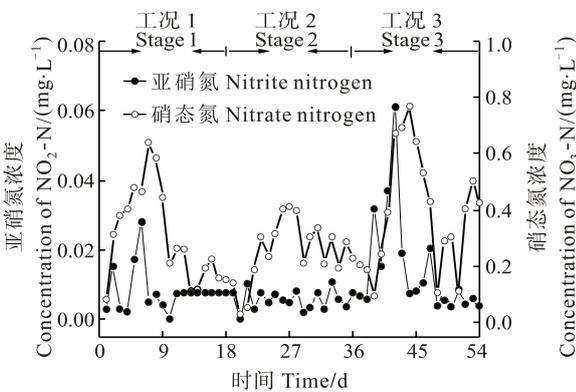


图3 海水人工湿地系统中 NO₂-N、NO₃-N 变化情况
Fig.3 The variation of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen in the constructed wetland

整体来看随着系统的运行, 水体中 NH₄-N 浓度逐渐降低, NO₃-N 浓度逐渐升高, 系统运行到每个工况的第5天, NO₃-N 浓度值达到波峰, 最高为 0.80 mg/L, 其后浓度开始降低。NO₃-N 浓度随着系统的处理呈先升高后降低的趋势, 这种波动趋势与张海耿等(2012)的研究极为相似, 可能与系统内部氧化还原环境有关。系统内 NO₂-N 浓度较低, 一般在 0.005–0.010 mg/L 内波动。

2.1.2 硝化反应对脱氮的影响 多数研究者认为, 硝化过程共分为两步进行(Schmidt *et al*, 2003; 许光辉等, 1986), 是自养型细菌将氨转化为亚硝酸盐和硝酸盐的过程。第一步, 亚硝化细菌将系统中大部分 NH₄-N 转化为亚硝酸盐, 反应时间较长, 所以系统运行初期 NO₂-N 的含量几乎没有, 第二步则由兼性的硝化细菌将亚硝酸盐快速转化为硝酸盐。运行初期, 系统中无机氮以 NH₄-N 为主, 随着反应时间的加长, NO₃-N 比例不断增加, 至第 7 天, 系统内 NO₃-N 的比例超过 90%。整个循环周期内, NO₂-N 浓度总体上变化不大, 所占比例在 0.37%–7.92%, 平均为 2.34%(图 4)。随着停留时间的增长, 循环周期末期系统内 NO₃-N 所占比例有所增加, 水力停留时间为 36 h, 当系统运行到第 8 天, NO₃-N 所占比例达到 95%。由此可见, 延长水力停留时间有利于系统内氨态氮向硝态氮充分转化。此外, 湿地植物互花米草自身生命活动也会吸收部分 NO₃-N, Balmér(2012)认为, 生长在湿地中的不同植物在湿地净化废水过程中对无机氮的吸收能力大小不同, 通常根系发达的水生植物生命活动中所需外界提供的营养物质相对较多, 进而更多的参与湿地系统对水质中氮的有效降解活动中。根据硝化过程的质量平衡显示(Sun *et al*, 2007), 湿地系统中被氧化的 NH₄-N 应近似等于 NO₂-N 和 NO₃-N 产生的量加上植物吸收的少量的氮。

一般认为, 硝化反应会受到温度、pH、DO、无机碳源、微生物群落以及系统中 NH₄-N 浓度等多种因素的影响, 系统进水采取喷洒式, 有效地增加了水体中的溶解氧, 加之互花米草特有发达的根系泌氧功能, 使得系统中、上层的好氧型硝化细菌发生一系列

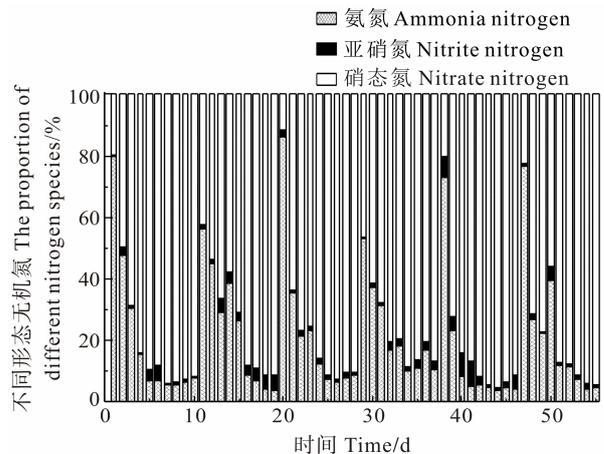


图4 人工湿地系统中 NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N 比例变化情况

Fig.4 The variation of percentages of ammonia nitrogen, nitrite nitrogen and nitrate nitrogen in the constructed wetland

的生化反应,加速了含 N 物质间的相互转化,便于被植物、动物、微生物吸收利用。系统内温度始终处于 25–31℃ 之间,对其整个系统内部植物、微生物的生命活动和新陈代谢的影响不明显。研究发现,异养菌也可以在硝化反应中扮演着重要的角色(Reddy *et al.*, 1997)。

2.1.3 反硝化反应对脱氮的影响 硝化反应产生的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 在厌氧的条件下被反硝化细菌还原为 N_2 和 N_2O ,因而系统中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度取决于硝化反应产生的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和反硝化反应消耗的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 两个方面。一般情况下,系统的上层植物区域溶氧较高,加之植物根区泌氧,反硝化反应会受到抑制,系统中下层有利于反硝化反应进行。系统运行初期,反硝化作用较小,系统中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 比例不断增加,到第 8 天, $\text{NO}_3\text{-N}$ 比例开始下降,反硝化作用增强。此时, TN 去除率亦相对较高,达到 30%。基质上层的互花米草在对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的去除过程中也起到一定作用。Kirk(2001)的研究表明,由于湿地植物根部的泌氧,即便在 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量占有绝对优势的情况下,植物也能吸收 $\text{NO}_3\text{-N}$,植物主要以吸收离子氮为主,也包括一些小分子含氮有机物如氨基酸等。但总的说来,植物吸收的作用相对有限,微生物硝化/反硝化脱氮依然是整个湿地系统处理外排水的主要途径(Sun *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2005),而 Liang 等(2000)和 Bachand 等(2000)研究表明,人工湿地氮的迁移转化过程中硝化作用能够彻底改变氮的存在形态从而降低 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量,反硝化在脱氮过程中发挥了至关重要的作用。

反硝化会受到温度、pH、DO、有机碳等因素的影响(Kuschik *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004)。试验中添加适量饵料和葡萄糖可为反硝化细菌提供有机碳源,有利于 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的去除。反硝化过程中产生的 N_2O 含量取决于反硝化氮的量以及产生的 N_2 和 N_2O 。多数研究者(Fleming *et al.*, 2002; Vymazal, 1999; Zheng *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 2000; Gerke *et al.*, 2001; Vymazal, 2007; Horne, 1995; Gao *et al.*, 1990; Vymazal *et al.*, 1998)认为,当 pH 值较低时,反硝化的第二步则受抑制,造成硝酸盐大量积累,当 $\text{pH}<4.0$ 时,产生 N_2O 为主, $\text{pH}>6.0$ 时,以产生 N_2 为绝对优势,因此用于污水处理的人工湿地的基质的 pH 值应高于 6.0,而本试验所测指标 pH 范围为 7.4–8.5,故此条件有利于反硝化脱氮的有效发挥。此外,越来越多的研究表明,在有氧条件下,反硝化反应依然可以进行(Laanbroek, 1990)。

2.1.4 氨化反应对脱氮的影响 系统中的氨化反应是将有机氮转化为氨的过程,但不是系统脱氮的关键环节。氨化细菌会受到温度、pH、溶氧、可利用

的能量物质的影响(Gerke *et al.*, 2001)。氨化反应属于好氧过程,会与硝化反应竞争部分氧气,所以溶解氧对于 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除影响较大。系统内部的氨化细菌将有机氮通过多步生化反应转化为氨,其本质是氨基酸的分解过程,溶氧高的区域氨化细菌异常活跃。当系统出水口溶氧为 4.5 mg/L 时, $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除率为 61.3%,明显高于溶氧为 2.0 mg/L 时的 25.4%。试验开始阶段 pH 值在 7.5 上下波动,而后随着系统的处理, pH 值有所升高。pH 值在 7.5–8.5 之间,氨挥发作用明显,当 pH 值小于 7.5 即可忽略(Gao *et al.*, 1990; Verhoeven *et al.*, 1999)。

2.2 酶活性

2.2.1 脲酶 人工湿地系统中不同采样点的基质脲酶活性见图 5。在下行池的 S1、S2、S5、S6 采样点脲酶活性较高,下行池的 S3 和上行池的 S4 脲酶活性相对较低。造成这种现象的原因可能是系统中上层微生物数量及有机物含量较高(梁威等, 2003; 李智等, 2005),另外下层温度较低,可能也是造成脲酶活性较低的原因之一。上层区域的互花米草产生大量根际分泌物刺激了较为敏感的脲酶,使其活性大小比较为 $\text{S2}>\text{S1}$, $\text{S6}>\text{S5}$,所以植物根区的分泌物在系统净化机理中不容忽视。

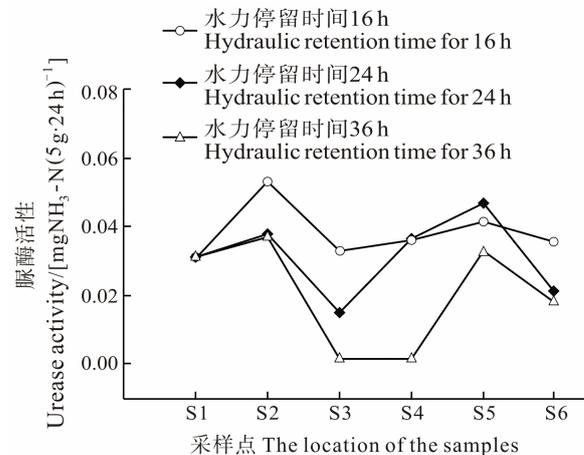


图 5 人工湿地系统不同采样点脲酶活性对比
Fig.5 The comparison of urease activity at different sampling positions of the constructed wetland

在水力停留时间为 16 h 条件下,各层次脲酶活性均达到 0.03 mg $\text{NH}_3\text{-N}/(5 \text{ g} \cdot 24 \text{ h})$ 以上,且活性分布均匀。mg $\text{NH}_3\text{-N}/(5 \text{ g} \cdot 24 \text{ h})$ 为 24 h 后 5 g 基质中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的毫克数,表示脲酶活性。而水力停留时间为 24 h 和 36 h 条件下的系统各层次脲酶活性呈现明显高低分布,活性最低为 0.002 mg $\text{NH}_3\text{-N}/(5 \text{ g} \cdot 24 \text{ h})$,最高可达到 0.047 mg $\text{NH}_3\text{-N}/(5 \text{ g} \cdot 24 \text{ h})$ 。由于水力停留时间较小,

使得系统内部各个微环境有机物含量均匀分布,避免了系统内部有机物局部堆积,充分为各层次微生物、植物、动物新陈代谢提供营养物质;另一方面,系统内外排水的快速流转对于水质升温也会产生一定影响。如果水体流速过大,水环境中的胞外酶物质会随着水体流出净化作业区,酶物质的流失量会大大降低系统对水质的净化作用,因此水流量的控制对于系统内部微生物数量的空间分布情况具有直接影响。

水力停留时间为 16 h,上、下行池脲酶活性相当,差异不显著($P>0.05$)。水力停留时间为 24 h,上行池脲酶活性明显高于下行池。水力停留时间为 36 h,下行池脲酶活性高于上行池。整体而言,较小的水力停留时间内脲酶活性高于较大的水力停留时间的脲酶活性,在水力停留时间为 16 h 条件下系统脲酶活性分别是 24 h、36 h 的 1.22、1.53 倍,差异显著($P<0.05$)。下行池添加基质多与上行池也影响着系统内微生物分布,基质水溶性、比表面积也与脲酶空间分布有关。基质脲酶变化与 TN 去除率亦存在显著相关关系,拟合方程为 $y=0.65x-0.15(R^2=0.79)$ 。

2.2.2 脱氢酶 根据图 6 数据显示,人工湿地系统内下行池和上行池区域 S1、S2、S5、S6 基质脱氢酶活性高于 S3、S4,特别是水力停留时间为 16 h 条件下的 S2 区域内的脱氢酶活性达到最高,为 $2.5 \mu\text{g/ml TPF}$ ($\mu\text{g/ml TPF}$:以每克基质生成的 TPF 为脱氢酶的一个活性单位)以上,这是由于系统中、上层基质是粒径较小的细珊瑚石、细砂,所以比表面积远远大于下层的粗珊瑚石,增大了内部脱氢酶附着点,另外互花米草的根区主要位于 S1、S2、S5、S6,这部分区域由于进水溶氧和根部泌氧的原因造成溶氧含量较高,形成了好氧环境,同时植物根区分泌物会刺激微生物的生命活动和生物量的增加,适合系统中好氧微生物的新陈代谢和生命活动,而微生物作为系统胞外酶的生产者,从而使系统中、上层酶活性较高。在水力停留时间为 24 h 和 36 h 条件下,下行池 S1、S2 与上行池 S5、S6 层脱氢酶活性相当,差异不显著($P>0.05$)。

水力停留时间 16 h 条件下,系统各层次脱氢酶活性明显高于 24、36 h 条件下的脱氢酶活性,差异极显著($P<0.01$),可能是由于开始阶段植株生长逐渐茂盛,植株根系发达,上层根区氧化还原电位也出现增高的趋势,所以整体提高了上层区域基质脱氢酶活性,不难看出互花米草的生长刺激了系统基质脱氢酶活性。随着水力停留时间为增加到 24、36 h 阶段植物生长缓慢,可能造成了植物根区氧化还原电位较低,使得脱氢酶活性明显下降。

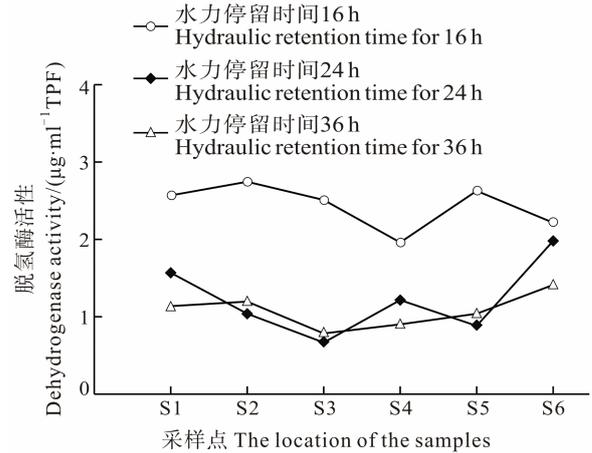


图 6 人工湿地系统不同采样点脱氢酶活性对比
Fig.6 The comparison of dehydrogenase activity at different sampling positions of the constructed wetland

水力停留时间为 16、24、36 h 条件下,上、下行池间脱氢酶活性基本一样,差异不显著($P>0.05$)。停留 16 h 条件下,系统下行池脱氢酶活性明显高于 24、36 h,分别是其 2.41、2.51 倍。下行池脱氢酶活性明显高于 24、36 h,分别是其 1.22、2.05 倍。不同水力停留时间下,停留 16 h 系统内脱氢酶活性远远高于停留 24、36 h 脱氢酶活性,分别是其 2.00、2.28 倍。

研究结果显示,人工湿地系统内的基质酶作为一种生物催化剂,加速了系统内部有机物质的化学反应,基质酶同微生物共同推动着物质转化,这也符合张巍等(2010)在人工湿地中酶活性对微生物功能体现的研究成果,各种酶在系统内部基质表层的附着积累是基质微生物、动物、耐盐植物生命活动的结果体现。脲酶可以酶促含氮有机物的水解。脱氢酶作为湿地系统内一种重要的有机质转化酶,能促使碳水化合物、有机物等发生脱氢反应,起着氢的中间传递体的作用(郭明等,2000)。因此,人工湿地中脲酶和脱氢酶活性的变化在很大程度上影响着系统对污染物的去除效果。

2.3 微生物分布

近几年来,关于湿地生态系统中微生物群落结构及分布、微生物降解机制等方面的研究日益受到研究者的重视(Huang *et al*, 2012; Truu *et al*, 2009)。微生物是人工湿地净化废水的主要作用者,它们把有机质作为营养源转化为组成物质和能量。Zhou 等(2009)在研究复合垂直流人工湿地时发现,系统表层的微生物数量显著高于其下层的数量。人工湿地处理污水时,有机物的降解和转化主要由植物根区微生物生命活动来完成。耐盐植物通过通气组织的运输,将氧气输送到根区,在植物根须周围微环境中依次出现好氧区、

兼氧区和厌氧区,为好氧微生物和厌氧微生物大量存在提供了条件。人工湿地中微生物的种类和数量极其丰富,这为人工湿地污水处理系统提供了足够的分解者。图 7 显示了水力停留时间 16、24、36 h 海水人工湿地基质表层微生物数量(单位 $\text{Lg}/\text{N}\cdot\text{g}$:表示每克基质中微生物数量的对数)的空间分布,其中下行池亚硝酸盐细菌、硝酸盐细菌和氨化细菌数量高于上行池,差异不显著($P>0.05$)。外排水刚进入系统时,主要发生硝化反应,氨氮和亚硝酸盐被氧化,硝化细菌和亚硝化细菌得到增殖,位于中上层的 S1、S2、S5、S6 硝化和亚硝化细菌的数量远远高于反硝化细菌,故在好氧环境的表层附近亚硝化细菌、硝化细菌增多,这与好氧微生物自身生命活动有直接关系。

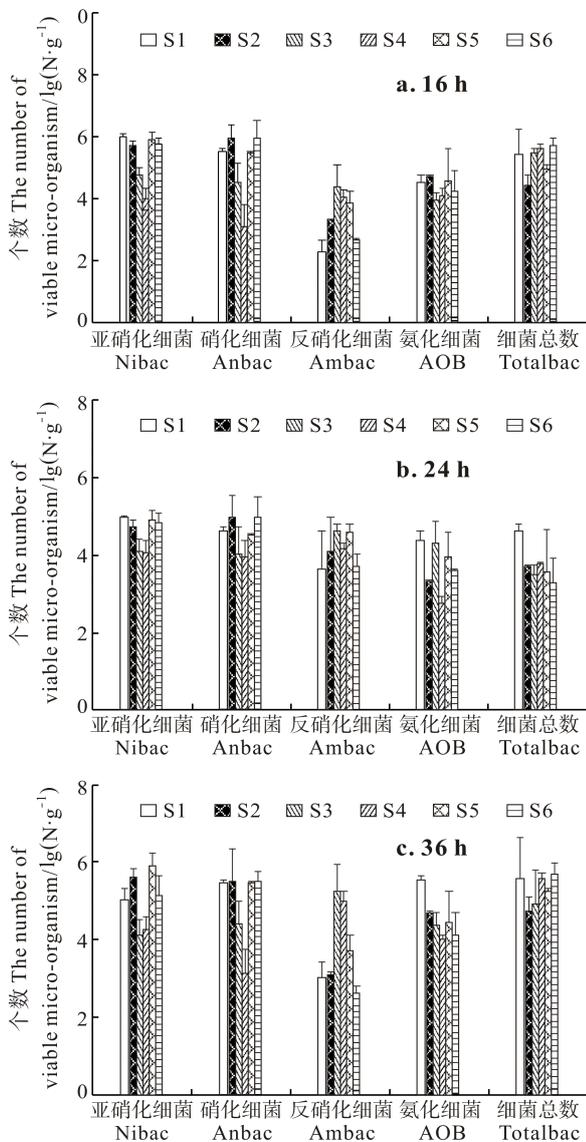


图 7 海水人工湿地系统内微生物空间分布
Fig.7 The spatial distributions of microbes in the constructed wetland

下行池 S3 区域内反硝化细菌数量明显高于上行池 S4, 由于实验中添加的适量饵料和葡萄糖, 随着系统内基质的吸附阻截, 有机物含量逐渐降低, 严重影响了厌氧型反硝化细菌的有机碳源供给, 造成反硝化细菌数量逐渐减少, 形成的这种趋势与黄有志等 (2013)研究的极其相似。水力停留 36 h 系统内部 S3、S4 反硝化细菌数量高于停留 24、16 h, 表明在此流量条件下湿地系统内部存在一定的厌氧区域, 正好有利于反硝化细菌的形成, 作用于 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的去除(将 $\text{NO}_3\text{-N}$ 转化为 N_2)过程。

在水力停留 16、36 h 条件下系统内氨化细菌的数量多于 24 h, 差异不显著($P>0.05$)。在停留 36 h 条件下氨化细菌数量多于停留 16、24 h, 停留时间较长意味着水流速度缓慢, 水中溶氧量相对较低, 表明在兼性厌氧环境下也可以培养氨化细菌, 为今后对于好氧型微生物适应兼性厌氧、厌氧环境下生存的研究提供有利数据。

水力停留时间为 36 h 系统中细菌总数超过 16、24 h, 水力停留时间较长一方面有利于系统内部长时间的稳定微环境, 有利于厌氧型微生物(反硝化细菌)和好氧型微生物(硝化细菌)的增殖;另一方面缓慢的水流流速避免了因水流过大而破坏系统内部成熟的微生物膜结构。但是间歇时间过长, 对于系统内部好氧型微生物的培养会造成一定影响。细菌总数与 TN 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 去除率存在正相关关系, 细菌总数越多, TN 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除率越高。细菌总数与 TN 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 去除率之间的关系方程分别为 $y=1.32x-0.83(R^2=0.50)$ 、 $y=0.80x-0.27(R^2=0.61)$ 。

由图 7 可知, 海水人工湿地系统内部硝化细菌与亚硝化细菌数量远远多于反硝化细菌数量, 充分证明了在此实验过程中, 海水人工湿地系统内部微生物的硝化作用大于反硝化作用。

3 结论

(1)海水人工湿地系统对养殖外排水中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的平均去除率为 $(82.91\pm 17.51)\%$, TN 平均去除率为 $(25.02\pm 12.69)\%$ 。

(2)系统中不同基质层次的微生物数量和脲酶、脱氢酶活性不同, 基质中上层好氧微生物数量和脲酶、脱氢酶活性显著大于下层; 系统下行池好氧微生物数量和脲酶活性大于上行池; 系统下层脱氢酶活性低于中上层。

(3)海水人工湿地净化养殖外排水系统下行池中上层硝化细菌、亚硝化细菌显著高于下层, 中上层反硝化细菌数量明显低于下层。

(4)系统内全部微生物数量和 TN 去除率存在一定相关性, $R^2=0.50$; 系统内基质脲酶与 TN 去除率存在显著相关性, $R^2=0.86$; 系统内微生物总数和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 去除率存在一定相关性, $R^2=0.61$ 。

参 考 文 献

- 王加鹏, 崔正国, 周强, 等. 人工湿地净化海水养殖外排水效果和微生物群落分析. 渔业科学进展, 2014, 35(6): 1-9
- 李智, 杨在娟, 岳春雷. 人工湿地基质微生物和酶活性的空间分布. 浙江林业科技, 2005(3): 1-5
- 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986
- 张海耿, 崔正国, 马绍赛, 等. 人工湿地净化海水养殖外排水影响因素与效果实验研究. 海洋环境科学, 2012, 31(1): 20-24
- 张巍, 赵军, 郎成明, 等. 人工湿地系统微生物去除污染物的研究进展. 环境工程学报, 2010, 4(4): 721-728
- 岳春雷, 常杰, 葛滢, 等. 人工湿地基质中土壤酶空间分布及其水质净化效果之间的相关性. 科技通报, 2004, 20(4): 112-116
- 苗婷婷, 刑翔, 杜宗军, 等. 柄海鞘共附生细菌的分离培养与系统发育多样性研究. 海洋科学进展, 2012, 30(1): 111-118
- 郭明, 陈红军, 王春蕾. 四种农药对土壤脱氢酶活性的影响. 环境化学, 2000, 19(6): 523-527
- 赵连梅, 池勇志, 张春青. TTC-脱氢酶活性测定中标准曲线的影响因素研究. 实验室科学, 2009, (4): 71-74
- 梁威, 胡洪营. 人工湿地净化污水过程中的生物作用. 中国给水排水, 2003, 19(10): 28-31
- 黄有志, 刘永军, 熊家晴, 等. 北方地区表流人工湿地冬季污水脱氮效果及微生物分布分析. 水处理技术, 2003, 39(1): 55-59
- Balmér P, Hellstrom D. Performance indicators for wastewater treatment plants. Water Sci Technol, 2012, 65(7): 1304-1313
- Bachand PAM, Horne AJ. Denitrification in constructed free-water surface wetlands: II. Effects of vegetation and temperature. Ecol Engin, 2000, 14(1-2): 17-32
- Bai JH, Ou YH, Deng W. A review on nitrogen transmission process in natural wet-lands. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(2): 326-333
- Correa-Galeote D, Marco DE, Tortosa G, *et al.* Spatial distribution of N-cycling microbial communities showed complex patterns in constructed wetland sediments. FEMS Microbiol Ecol, 2013, (2): 340-351
- Ding JH, Shu Q. Application of constructed wet lands for wastewater treatment. Agro-Environmental Protection, 2000, 19(5): 320
- Fleming SMS, Horne AJ. Enhanced nit rate removal efficiency in wetland microcosms using an episediment layer for denitrification. Environment Science Technol, 2002, 36: 1231-1237
- Gao ZM, Li XF, Wang ST. Treatment for Municipal Wastewater Treatment. Beijing: Standard Press of China, 1990, 458
- Gerke S, Baker LA, Xu Y. Nitrogen transformations in a wet land receiving lagoon effluent: sequential model and implications for water reuse. Water Res, 2001, 35(16): 3857-3866
- Greenway M. Nutrient content of wetland plants in constructed wetlands receiving municipal effluent in tropical Australia. Water Sci Technol, 1997, (5): 135-142
- Horne AJ. Nitrogen removal from waste treatment pond or activated sludge plant effluents with free surface wetlands. Water Sci Technol, 1995, 31(12): 341-351
- Hammer DA. Constructed wetlands for wastewater treatment municipal, industrial and agricultural. Proc. 1st internal conference on constructed wetlands for wastewater treatment. Chattanooga, USA, Lewis Publishing, Chelsea, 1988
- Huang L, Gao X, Liu M. Correlation among soil microorganisms, soil enzyme activities, and removal rates of pollutants in three constructed wetlands purifying micro-polluted river water. Ecol Engin, 2012, 46: 98-106
- Kadlec RH, Knight RL. Treatment Wetlands. Boca Raton, FL: Lewis CRC Press, 1996
- Kirk GJD. Plant-mediated processes to acquire nutrient s: nitrogen up take by rice plants. Plant and Soil, 2001, 232: 129-134
- Kusch P, Winner A, Kappelmeyer U, *et al.* Annual cycle of nitrogen removal by a pilot-scale subsurface horizontal flow in a constructed wetland under moderate climate. Water Res, 2003, 37: 4236-4242
- Huang F, Han T, Qin L. East China Normal University. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2011, 36(14): 1945-1950
- Laanbroek HJ. Bacteria cycling of minerals that affect growth in waterlogged soils: a review. Aquat Bot, 1990, 38: 109-125
- Liang W, Wu ZB. Review of removal mechanism in constructed wetland treating nitrogen and phosphorus from wastewater. Environmental Science Trends, 2000, (3): 32-37
- Lu SY, Zhang PY, Yu G, *et al.* Stabilization pond-plant bed composite system treatment of farmland irrigation and drainage water. China Environmental Science, 2004, 24(5): 605-609
- Menon R, Jackson CR, Holland MM. The influence of vegetation on microbial enzyme activity and bacterial community structure in freshwater constructed wetland sediments. Wetlands Vol, 2013, 33(2): 365-378
- Pinney ML, Westerhoff PKM, Bakerm L. Transformations in dissolved organic carbon through constructed wetlands. Water Res, 2000, 34(6): 1897-1911
- Reddy KR, D'Angelo EM. Biogeochemical indicators to evaluate pollution removal efficiency in constructed wetlands. Water Sci Technol, 1997, 35(5): 1-10
- Schmidt I, Slikers O, Schmid M, *et al.* New concepts of microbial treatment process for the nitrogen removal from wastewaters. FEMS Microbiol Rev, 2003, 27: 481-492
- Smith ID. Athermal analysis of absue vertical flow constructed wetland. Water Science & Technology, 1997, (5): 55-62
- Song K, Lee SH, Kang H. Denitrification rates and community

- structure of denitrifying bacteria in newly constructed wetland. *Eur J Soil Biol*, 2011, 47(1): 24–29
- Stottmeister U, Wiener A, Kuschik P, *et al.* Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotech Adv*, 2003, 22(1–2): 93–117
- Sun GZ, Austin D. Completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite in lab-scale constructed wetlands: Evidence from a mass balance study. *Chemosphere*, 2007, 68:1120–1128
- Truu M, Juhanson J, Truu J. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(13): 3958–3971
- Verhoeven JTA, Meuleman AFM. Wetlands for wastewater treatment: Opportunities and limitations. *Ecol Engin*, 1999, 12(1–2): 5–12
- Vymazal J. Nitrogen removal in constructed wetlands with horizontal sub surface flow can we determine the key process? In: Vymazal J ed. *Nutrient cycling and retention in natural and constructed wetlands*. Leiden: Backhuys Publishers, 1999, 1–17
- Vymazal J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 2007, 380: 48–65
- Vymazal J, Brix H, Cooper PF. Removal mechanisms and types of constructed wetlands. In: Vymazal J, Brix H, Cooper PF, *et al* eds. *Constructed wet lands for wastewater treatment in Europe*. Leiden: Backhuys Publishers, 1998, 17–66
- Zheng XC, Li YX. *Technology of phosphorus and nitrogen removal from wastewater*. Beijing: China Architecture & Building Press, 1998
- Zhou QH, He F, Zhang L, *et al.* Characteristics of the microbial communities in the integrated vertical-flow constructed wetlands. *J Environ Sci*, 2009, 21(9): 1261–1267

(编辑 陈严)

Substrate Enzyme, Microbe Distribution and Denitrification Effects of the Constructed Sea Water Wetland

ZHOU Qiang^{1,2}, CUI Zhengguo², WANG Jiapeng^{1,2}, QU Keming^{2①}, MA Shaosai², MAO Chengquan³

(1. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306*; 2. *Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071*; 3. *Haiyang Yellow Sea Aquatic Product Co., Ltd, Yantai 265122*)

Abstract The substrate enzyme activity and the spatial distribution of microorganisms are important factors affecting the degradation of pollutants in water treatment system of the constructed wetland. The present study using a laboratory scale constructed wetland system in three different conditions to measure the removal effects of nitrogen, the relationship between the removal efficiency and the spatial distributions of microorganisms and the substrate enzyme activity. *Spartina alterniflora* was selected as the plant of the constructed wetland, and the density of reed was 64 per square meter. The substrates were filled with fine sand, coral rock and blast furnace slag. In three different conditions, the removal rate of different forms of nitrogen, the quantity and activity of microorganisms, the substrate activity were investigated. The results showed that the average removal rate of TN and NH₄-N were (25.02±12.69)% and (82.91±17.51)% in the constructed wetland system during two-month stable operation, respectively. The quantities of microorganisms in different depths were obviously different, and the activities of substrate urease and dehydrogenase were different with depths. The quantities of aerobic microorganisms, the activities of urease and dehydrogenase in the upper and middle layer were significantly higher than those in the lower layer of the system. In the down flow tank of the system, the quantities of nitrifying and nitrite bacteria in the upper and middle layer were higher than those in the lower layer; however, the distribution of denitrifying bacteria was opposite. There were positive correlations between the removal rate of nitrogen and the quantity of bacteria and the enzyme activity ($R^2=0.50$ and 0.61 , respectively). There was a significant positive correlation between the total nitrogen removal rate and the activity of urease ($R^2=0.86$). The results contribute to the migration mechanism of nitrogen in the constructed wetland system of treating marine aquaculture waste waters.

Key words Constructed wetland; Nitrogen; Removal rate; Enzyme activity; Microbial

① Corresponding author: QU Keming, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn