



文章栏目：水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.202010136

中图分类号 X703

文献标识码 A

潘福霞, 来晓双, 王树志, 等. 曝气条件下进水 C/N 对水平潜流型人工湿地脱氮效果和氮转化功能微生物丰度的影响[J]. 环境工程学报, 2021, 15(4): 1386-1394.

PAN Fuxia, LAI Xiaoshuang, WANG Shuzhi, et al. Influence of C/N ratio on the nitrogen removal and functional microbial abundance under aeration condition in horizontal subsurface flow constructed wetlands[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(4): 1386-1394.

曝气条件下进水 C/N 对水平潜流型人工湿地脱氮效果和氮转化功能微生物丰度的影响

潘福霞^{1,*}, 来晓双², 王树志², 王惠²

1. 山东师范大学环境与生态研究院, 济南 250358

2. 济南大学水利与环境学院, 济南 250022

第一作者: 潘福霞 (1985—), 女, 博士, 讲师。研究方向: 污水处理技术。E-mail: fxpan2020@163.com

*通信作者

摘 要 为提高潜流型人工湿地在低 C/N 条件下的污水处理效果, 考察了在植物生长旺盛期曝气条件下不同 C/N (0.9:1、2:1、4:1) 对污水的脱氮效率、微生物群落结构和功能微生物丰度的影响。结果表明: NO_3^- 去除率为 57.48%~83.19% 且随 C/N 的增加而增加; 当 C/N 为 2 和 4 时, 可提高 COD 和 TN 的去除率, COD 和 TN 去除率均达到 80% 以上。当 C/N 为 2 和 4 处理组的 *nirK*、*nosZ*、厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因丰度均显著高于当 C/N 为 0.9 时的处理组 ($P < 0.05$); *nxrA* 基因丰度随 C/N 增加而降低。物种数、Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数、Chao1 指数均随 C/N 的增加而增加。在不同处理组中相对丰度较高的细菌均为变形菌门和酸杆菌门, 其占总细菌序列的 62.89%~69.66%。对细菌群落结构进行 PCoA 分析, 发现不同处理组间微生物群落组成结构差异较大。由此可见, 在植物生长旺盛期, 调节 C/N 为 2 和 4 均可显著提高污水处理效果, 曝气和添加碳源强化措施可通过改变基质中氮转化功能微生物丰度和微生物群落结构来提高低 C/N 污水处理效率。

关键词 脱氮效率; 曝气; 低 C/N 污水; 功能基因丰度; 微生物群落结构

氮素是导致水体富营养化的重要营养物质之一, 污水处理厂总氮排放标准为 $15\sim 20\text{ mg L}^{-1}$, 远高于地表水环境质量标准 (GB 3838-2002)。过量的氮排入地表水会造成水体富营养化。因此, 对污水处理水厂的二级处理出水进行再处理尤为迫切, 而潜流型人工湿地因其处理效率高和具有多重生态服务功能而在污水再处理中得到广泛应用^[1]。潜流型人工湿地是通过植物、微生物、基质间的协同作用实现氮去除。有研究^[2-5]表明, 植物吸收和基质吸附对氮去除的贡献较小, 微生物对氮的转化利用才是主要的脱氮途径。潜流型人工湿地微生物脱氮主要依靠硝化和反硝化过程^[6], 介导硝化反应的细菌主要是好氧的自养微生物, 而介导反硝化过程的微生物主要是厌氧的异养微生物^[7], 且该过程需要碳源提供电子受体。传统的人工湿地中总氮去除率为 40%~55%^[8], 很多人工湿地总氮处理效率均低于 50%^[9]。氮去除主要受氧气和有机碳不足的限制^[10], 因此, 亟需采取强化措施提高

收稿日期: 2020-10-26; 录用日期: 2021-01-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41801089, 41877424)

人工湿地脱氮效率。LAI等^[11]对曝气条件下的垂直流人工湿地的脱氮效果进行了研究并发现,在C/N由3增加到12的过程中,TN、NO₃⁻、COD去除率随C/N增加而增加,但C/N过高会抑制NH₄⁺的去除。CHEN等^[12]的研究表明,在无曝气、碳源缺乏条件下(C/N=1.6),因NO₃⁻与NO₂⁻竞争电子受体,导致NO₂⁻积累;而在C/N增加到2.8时,在种植植物下TN去除率可达99%,且无NO₂⁻积累。曝气和C/N对低C/N污水中氮转化途径具有重要影响,然而,曝气条件下低C/N污水处理效果和微生物对不同C/N的响应仍不清楚。

在植物生长旺盛期,植物根系分泌物中的可溶性糖和小分子有机酸(乙酸、草酸、琥珀酸等)可以为反硝化微生物提供部分碳源^[13]。已有文献中,多采用5:1、10:1、15:1等较高的C/N研究不同C/N对人工湿地污水处理效果^[14-15]。然而在高C/N条件下,虽然氮去除效率较高,但也会消耗更多的可溶性氧,会限制好氧硝化过程;同时,过量的碳源也会增加二次污染的风险^[16-17]。因此,只有平衡碳源和可溶性氧的需求才能实现最佳的氮去除效果,节能减耗。本研究在芦苇旺盛期开展,评价了在曝气条件下不同低C/N(0.9:1, 2:1, 4:1)对污水的处理效果,阐明了在低C/N污水处理中氮去除的微生物机制,以为水平潜流型人工湿地的节能运行提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验地点

供试湿地为水平潜流型人工湿地,位于济南市西区污水厂,该区域属暖温带大陆性季风气候。共设有3个湿地单元,湿地单元面积为24.05 m²(长6.50 m,宽3.70 m),每个湿地单元设有独立的进水系统和曝气装置。水平潜流型人工湿地基质由下而上依次是粗砂、粗砾石、细砾石、细砂、粗砂、土壤种植层,各层厚度分别为0.10、0.30、0.30、0.15、0.10、0.20 m。湿地进水为污水处理厂的尾水,尾水排放执行《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB 18918-2002)中的一级A标准,COD、NH₄⁺、TN、TP年均浓度为20.00、7.20、22.00、2.01 mg·L⁻¹。湿地进水为连续进水,人工湿地水力负荷为0.33 m³·(m²·d)⁻¹。

1.2 实验处理与样品采集

潜流型人工湿地种植植物为芦苇,种植密度为16株·m⁻²。曝气装置安装在进水端,曝气条件为(1.0±0.2) L·min⁻¹。选用甲醇作为外加碳源,共设置3个处理,即不加甲醇对照C/N为0.9:1(CW0)、添加甲醇调节C/N为2:1(CWH)、添加甲醇调节C/N为4:1(CWC)。在每个供试潜流型人工湿地单元的进水端采用点滴输液器将甲醇均匀地添加至湿地进水中。实验周期为90 d,于2019年7月1日添加碳源,预培养30 d后开始采集水样。实验结束后采集基质样品,首先移除采样点表面的种植土、粗砂,继续深挖砾石填料直至出现水面或显著的水浸痕迹,按照S形取样法,采集5个点的样品混匀,取上层粗砂、细砂、细砾石填料各100 g,装入无菌封口袋,按照相同的取样方法采集不同的点位混匀后作为重复。采集的基质样品用液氮急冻,置于放有冰袋的保温箱中,运至实验室,存放至-20℃。

1.3 水质监测

预运行30 d后采集水质样品,分别于运行39、48、57、66、75、84、93 d采集进水和出水,水样采集时间为上午10:00,在每个湿地单元的进水口和出水口每隔5 min采集1次,共采集3次作为重复。水质测定指标为COD、NH₄⁺、NO₃⁻、TN。COD采用重铬酸钾法(HJ/T 399-2007)测定,TN浓度使用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法(HJ 636-2012)测定,NH₄⁺浓度采用纳氏试剂比色法(GB/T 5750-2006)测定,NO₃⁻浓度采用紫外分光光度计法^[18]测定。

1.4 DNA提取

将采集的填料样品放入塑料杯中,加超纯水100 mL,用超纯水涡旋振荡10 min洗脱生物膜,

取上清液于 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集微生物富集物。称取约 0.10 g 土壤样品和 0.10 g 洗脱下来的生物富集物, 采用 E. Z.N.A. Soil DNA Kit (D5625, Omega, Inc., USA) 提取。DNA 提取步骤按照试剂盒说明书的操作程序进行。最后 DNA 溶解于 60 μL solution 6 溶液中。利用 NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) 测定 DNA 浓度、检测 DNA 质量。

1.5 定量 PCR

利用实时定量 PCR 检测仪 (Bio-Rad, USA) 测定功能基因丰度, *anammox* 16S rRNA、*amoA*、*nirA*、*nirK*、*nirS*、*nosZ* 引物序列^[19-23] 如表 1 所示。引物序列由金斯瑞生物科技有限公司合成。定量 PCR 反应液体系为 20 μL , 其中包含 10 μL SYBR 2 Premix Ex Taq (Takara Shuzo, Shiga, Japan), 正向引物和反向引物各 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 0.2 μL 牛血清蛋白 (BSA, 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 2 μL 10 倍稀释的 DNA (浓度在 10~20 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 作为模板, 6.2 μL 灭菌水。每个样品设置 3 个重复。将含有正确目的基因的质粒 10 倍梯度稀释后作为标准曲线。每次定量均需测定用灭菌水为模板的阴性对照。溶解曲线只出现 1 个特殊峰。扩增效率在 90%~110% 才可以应用。

表 1 目的基因定量 PCR 引物
Table 1 Primers of target genes used in quantitative PCR

基因	引物	引物序列 (5'~3')	扩增长度/bp
<i>anammox</i> 16S rRNA	AMX809F	GCCGTAAACGATGGGCACT	257
	AMX1066R	AACGTCTCACGACACGAGCTG	
<i>amoA</i>	<i>amo</i> 598f	GAATATGTTTCGCCTGATTG	120
	<i>amo</i> 718r	CAAAGTACCACCATACGCAG	
<i>nirA</i>	F1norA	CAGACCGACGTGTGCGAAAG	322
	R1norA	TCYACAAGGAACGGAAGGTC	
<i>nirK</i>	<i>nirK</i> 583F	TCA TGGTGCTGCCGCGKACGG	326
	<i>nirK</i> 909R	GAA CTTGCCGCTGCCCCAGAC	
<i>nirS</i>	<i>nirS</i> cd3aF	GT(C/G)AACGT(C/G)AAGGA(A/G)AC(C/G)GG	425
	<i>nirS</i> R3cd	GA(C/G)TTCGG(A/G)TG(C/G)GTCTTGA	
<i>nosZ</i>	<i>nosZ</i> 1527F	CGCTGTTCHTCGACAGYCA	250
	<i>nosZ</i> 1773R	ATRTCGATCARCTGBTCGTT	

1.6 高通量测序

采用高通量 Illumina MiSeq300 平台测定细菌序列, 16S rDNA V3-V4 区扩增引物为 338F (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG), 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT)^[21]。用 2% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测, 检测合格后用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目标片段。扩增产物送至联川生物技术股份有限公司 (杭州, 中国) 进行细菌组分分析。检测合格的序列按照 97% 的序列相似度聚类成 OTU, 采用 QIIME1.8.0 分析细菌群落结构和 α 多样性, 利用 RDP (Ribosomal Database Project) 对物种进行分类。

1.7 数据处理

采用 Excel 2013 和 SPSS 19.0 软件对水质数据和功能基因拷贝数进行分析, 方差分析和差异显著性比较用单因素 (one-way ANOVA) 和邓肯 (Duncan) 法分析, 文中所有图采利用 Sigmaplot 12.5 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同处理的湿地中污染物的去除率

曝气和添加碳源强化措施处理的水平潜流型人工湿地对 COD、TN、 NH_4^+ 去除率如图 1 所示。CW0(C/N=0.9)、CWH(C/N=2)、CWC(C/N=4) 的 COD 平均去除率分别为 71.20%、80.32%、80.40%。在曝气条件下添加碳源可增加 COD 的去除率，CWC、CWH 中 COD 的去除率均显著高于 CW0 ($P<0.05$)，但 CWC 与 CWH 之间无显著差异 ($P>0.05$)。在曝气条件下添加碳源可增加总氮的去除率，各处理的总氮去除率均高于 70%，表现为 CWH、CWC 的 TN 平均去除率显著高于 CW0 ($P<0.05$)，CWH 和 CWC 的 TN 平均去除率分别为 82.59% 和 80.52%，两者之间无显著差异 ($P>0.05$)。在不同 C/N 下 NH_4^+ 去除率无显著差异 ($P>0.05$)，CW0、CWH、CWC 的 NH_4^+ 平均去除率分别为 83.68%、83.65%、82.85%。硝态氮去除率随 C/N 增加显著增加，CW0、CWH、CWC 的 NO_3^- 平均去除率分别为 57.48%、78.52%、83.19%。

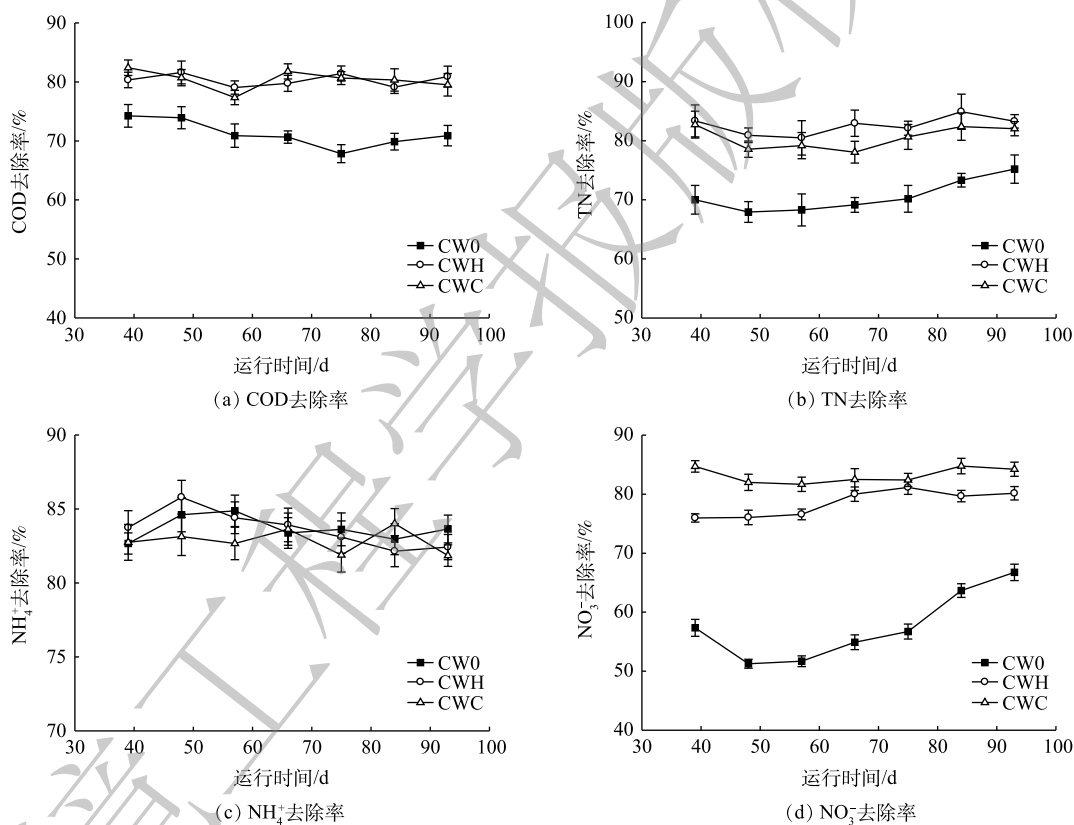


图 1 不同 C/N 处理的 COD、TN、 NH_4^+ 、 NO_3^- 去除率

Fig. 1 Removal rates of COD, TN, NH_4^+ and NO_3^- of different C/N ratio treatments

2.2 不同处理下氮转化功能基因丰度

氮转化过程中的主要功能基因丰度如图 2 所示。CW0、CWC、CWH 的 anammox 16S rRNA 基因丰度分别为 5.19、5.67 和 5.79 log 拷贝数·g⁻¹，CWC 和 CWH 处理的 anammox 16S rRNA 丰度均显著高于 CW0 ($P<0.05$)，而 CWC 与 CWH 处理间无显著差异 ($P>0.05$)。amoA 基因和 nxrA 基因是硝化过程的标记物，CW0、CWH、CWC 的 amoA 基因和 nxrA 基因丰度分别为 3.83、3.81、4.02 log 拷贝数·g⁻¹ 和 3.98、3.68、3.52 log 拷贝数·g⁻¹。CW0 处理的 nxrA 基因丰度显著高于 CWH 和 CWC 处理 ($P<0.05$)，而 CWC 和 CWH 处理间无显著差异 ($P>0.05$)。

nirS、*nirK*、*nosZ*是反硝化过程的主要功能基因。CW0、CWH、CWC处理的*nirS*基因丰度分别为3.76、3.79、3.91 log 拷贝数·g⁻¹，不同处理间无显著差异($P>0.05$)。提高碳氮比显著增加了*nirK*基因丰度，CW0、CWH、CWC处理的*nirK*基因丰度分别为3.75、4.71和4.46 log 拷贝数·g⁻¹，CWC和CWH处理的*nirK*基因丰度显著高于CW0处理($P<0.05$)。CW0、CWH、CWC处理的*nosZ*基因丰度分别为2.78、2.65和2.26 log 拷贝数·g⁻¹，不同处理的*nosZ*基因丰度与*nirK*基因丰度具有相同的趋势，均表现为加碳源处理组显著高于不加碳源的对照组。

2.3 不同处理下微生物群落结构分析

1) 微生物群落丰富度和多样性分析。CWH和CWC处理的物种数均高于CW0，CWC、CWH处理的物种数较CW0增加了13.36%和7.64%(表2)。表征细菌多样性的Shannon-Wiener和Simpson指数、表征群落丰富度的Chao1指数均表现为随C/N增加而增加的趋势，这说明添加碳源增加了物种多样性和丰富度。

2) 细菌在门水平的群落组成。选取丰度排名前10位的物种进行分析(图3)。变形菌门和酸杆菌门相对丰度较高，分别为32.26%~47.11%和21.38%~35.10%。所有处理中均表现为变形菌门丰度最高，CWC处理的变形菌门相对丰度(47.11%)显著高于CWH处理(32.26%)和CW0处理(34.56%)($P<0.05$)。而加碳源显著降低了酸杆菌门丰度($P<0.05$)，CW0处理(35.10%)的酸杆菌门丰度是CWC处理(21.38%)和CWH处理(30.63%)的1.64倍和1.15倍。CWC(4.05%)和CWH(6.14%)的厚壁菌门(*Firmicutes*)相对丰度均显著高于CW0(1.80%)($P<0.05$)。CWC处理的拟杆菌门(*Bacteroidetes*)相对丰度(2.98%)显著高于CWH处理(2.03%)和CW0处理(2.00%)($P<0.05$)。CW0、CWH、CWC的硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)相对丰度分别为1.87%、1.77%、1.45%，硝化螺旋菌门相对丰度随C/N增加呈逐渐降低趋势。

2.4 微生物群落结构差异性分析

对细菌高通量测序结果(图4)进行PCoA分析发现，加碳源处理(CWC、CWH)与CW0在PCo1和PCo2轴上均距离较远，说明其微生物群落组成结构差异较大，添加碳源对人工湿地基底层微生物群落组成的影响较大。PCo1解释量为54.77%，CWH和与CWC位于PCo1轴的正值端，

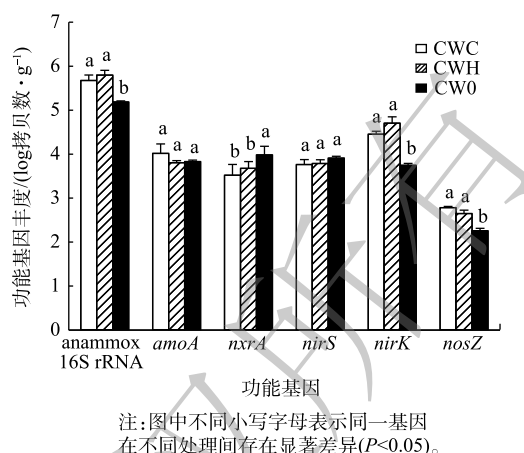


图2 不同处理的氮转化功能基因丰度

Fig. 2 Copy number of functional genes related to nitrogen metabolism in different treatments

表2 不同处理的微生物群落丰富度和多样性指数

Table 2 Richness and diversity indices of the microbial communities in different treatments

处理	物种数	Shannon-Wiener	Simpson	Chao1
CW0	2 186	9.738	0.994	3 616.17
CWH	2 353	9.742	0.995	4 103.56
CWC	2 478	9.819	0.996	4 326.24

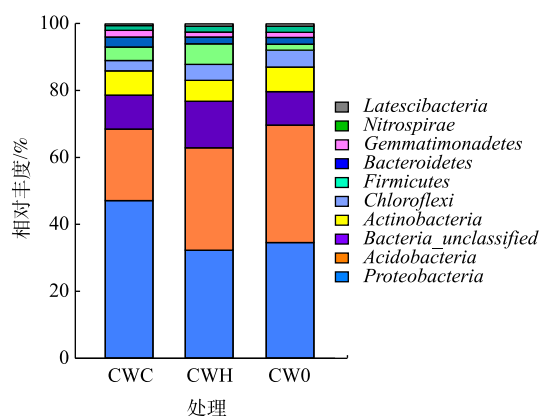


图3 不同湿地基质中门水平细菌群落结构组成分布

Fig. 3 Taxonomy of the relative abundances of bacterial communities at phylum-level in the substrate of different constructed wetlands

CW0 位于 PCo1 轴的负值端。PCo2 的解释量为 25.65%，CWC 和 CWH 位于 PCo2 轴的正值端，CW0 在 PCo2 轴的负值端。

3 讨论

3.1 强化措施对低 C/N 污水中氮去除率的影响

碳源和可溶性氧是水平潜流型人工湿地中有机质和氮去除的重要影响因子。对曝气条件下低 C/N 污水的处理结果表明，CW0、CWH、CWC 处理的出水中 COD 无显著差异，这说明在本研究中不同 C/N 处理均未造成二次污染。 NO_3^- 去除率随 C/N 的增加而增加，CW0 处理的

C/N 显著低于 CWH 和 CWC。这说明在低 C/N 条件下，由于碳源缺乏导致电子供体不足抑制了反硝化过程，随着碳源增加，异养反硝化微生物快速生长繁殖，改善了反硝化速率^[10]。CWH 和 CWC 处理的 TN 去除率显著高于 CW0，CWH 和 CWC 处理间无显著差异，说明 TN 去除率并非随 C/N 增加而增加，这与 CHEN 等^[24]的研究结果一致。潜流型人工湿地脱氮效率受基质、植物、微生物等多种因素的影响，在人工湿地实际运行过程中，发挥作用的碳源并非只是污水中的碳源。湿地植物根际有机碳释放速率、根系分泌物类型或数量均会影响根系周围微生物丰度和活性^[25]。ZHAI 等^[26]根据湿地植物 DOC 释放速率推测，每年根系分泌物能够促进人工湿地反硝化脱氮 $94\sim 267\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 。在低碳高硝态氮污水处理中，根系分泌物是潜在的重要碳源。本研究中，供试人工湿地已运行 3 a，所种植物芦苇为多年生植物，根系较发达，且该实验在植物生长旺盛期开展，故根系分泌物释放量较高。另外，植物根系残茬腐解亦释放部分碳源，也可以为低 C/N 污水处理提供碳源^[27]。本实验中，在芦苇生长旺盛期，当 C/N 分别为 2 和 4 时，很多指标并未呈现出显著差异。这可能是由于植物根际效应对低 C/N 污水处理中氮转化功能微生物的影响较大，削弱了外源碳添加导致的处理间的差异。一方面，根系能够为附着的微生物提供较大的表面积，为根际微生物提供适宜的生存条件，因而促进了微生物的生长繁殖^[28]；另一方面，植物根系分泌物会改变微生物群落结构，提高氨氧化细菌和反硝化细菌丰度^[13,29]。本研究仅对低碳氮比条件下人工湿地运行开展了初步的探索，至于植物根际效应与氮转化功能微生物相关性、根系分泌物释放量和植物根腐解释放碳源等因素与污水处理效果的相关性还有待深入的研究。

3.2 强化措施对氮转化功能微生物丰度和群落结构的影响

为了解强化措施对低 C/N 污水氮转化过程的影响，对硝化、反硝化和厌氧氨氧化过程的主要功能基因进行了分析。本研究中，厌氧氨氧化 16S rRNA 基因丰度表现为添加碳源处理 (C/N 为 2.0 和 4.0) 显著高于对照处理。厌氧氨氧化过程的发生与底物浓度和厌氧条件有关，添加碳源促进了反硝化过程的发生，底物 NO_2^- 浓度增加，为厌氧氨氧化过程提供了充足的底物；此外，有机物氧化消耗可溶性氧造成的厌氧条件也促进了厌氧氨氧化过程的发生^[10]。本研究中，不同处理的 *amoA* 丰度无显著差异，而不加碳源处理的 *nxrA* 基因丰度显著高于加碳源处理。这与以前研究结果不一致。大多研究认为，有机物氧化会与氨氧化过程竞争氧气，*amoA* 和 *nxrA* 丰度随 C/N 增加而降低，硝化过程受抑制^[11-12]。造成本研究结果与前人研究结果不一致的原因是：前人研究^[10-11]中 C/N 较高 ($\text{C/N}\geq 6$)，而本研究中 C/N 较低 ($\text{C/N}\leq 4$)，且进水中可溶性氧含量可以为硝化过程提供部分氧气，并未限制氨氧化过程。*nxrA* 介导的是硝化反应的第二步，加入碳源增加了氧气消耗，而进水中的可溶性氧不足以供应 NO_2^- 氧化为 NO_3^- 过程的发生，因有机物降解与亚硝酸盐氧化过程竞争

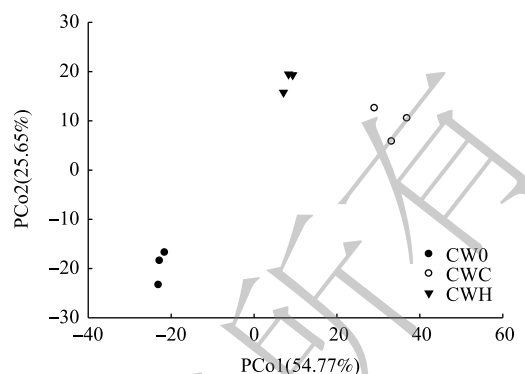


图4 不同 C/N 条件下微生物群落主坐标 (PCoA) 分析

Fig. 4 Principal Coordinate Analysis of microbial communities at different C/N ratios

可溶性氧, NO_2^- 氧化为 NO_3^- 的过程受抑制^[30]。反硝化微生物主要是异养微生物, 添加甲醇作为碳源可以促进反硝化脱氮^[10]。本研究中, 不同处理的 *nirS* 基因丰度无显著差异, 而 CWH、CWC 处理的 *nirK* 基因丰度显著高于 CW0 处理, 添加碳源对 *nirS* 和 *nirK* 基因丰度产生不同影响的原因是 *nirK* 基因对环境变化较敏感, 其丰度受环境因素的影响显著^[31]。CWC 和 CWH 处理的 *nosZ* 基因丰度均高于 CW0 处理, *nosZ* 基因通常作为完全反硝化的标志基因, 说明添加碳源促进了完全反硝化过程的发生^[31]。

对潜流型人工湿地基质微生物群落结构的分析表明, 添加碳源增加了物种多样性和丰富度。这与 LI 等^[32]的研究结果一致。他们发现, 在 C/N 为 2:1 时物种数量最高, 在低 C/N 的条件下, 植物根系发达促进了微生物的附着和生长。本研究中, 所有处理均表现为变形菌门丰度最高, 这与前人的研究^[33]结果一致。变形菌门细菌种类繁多, 广泛参与碳、氮循环过程。CWH 处理的厚壁菌门丰度最高, 厚壁菌门能够执行异养反硝化的过程^[34], 这也是添加碳源能够提高反硝化效率的原因之一。硝化螺旋菌门相对丰度随 C/N 增加呈逐渐降低趋势, 说明添加碳源增加了对氧气的消耗, 从而抑制了硝化微生物生长繁殖^[12], 不同碳氮比对硝化菌组分的影响还有待进一步研究。

4 结论

- 1) 人工湿地在植物生长旺盛期, 在曝气条件下调节 C/N 为 2 和 4 均可显著提高 TN 和 NO_3^- 的去除率。
- 2) 添加碳源改变了氮转化功能基因丰度, 在 C/N 为 2 和 4 处理中的 *nirK*、*nosZ*、厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因丰度均显著高于对照。
- 3) 添加碳源可增加物种的丰富度, 从而改变细菌群落的结构。

参 考 文 献

- [1] WU H, FAN J, ZHANG J, et al. Large-scale multi-stage constructed wetlands for secondary effluents treatment in northern China: Carbon dynamics[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 233: 933-942.
- [2] DU L, TRINH X T, CHEN Q R, et al. Enhancement of microbial nitrogen removal pathway by vegetation in integrated vertical-flow constructed wetlands (IVCWs) for treating reclaimed water[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 644-651.
- [3] HAN Z F, DONG J, SHEN Z Q, et al. Nitrogen removal of anaerobically digested swine wastewater by pilot-scale tidal flow constructed wetland based on in-situ biological regeneration of zeolite[J]. *Chemosphere*, 2019, 217: 364-373.
- [4] GAGNON V, CHAZARENC F, COMEAU Y, et al. Influence of macrophyte species on microbial density and activity in constructed wetlands[J]. *Water Science and Technology*, 2007, 56: 249-254.
- [5] ZHUANG L, YANG T, ZHANG J, et al. The configuration, purification effect and mechanism of intensified constructed wetland for wastewater treatment from the aspect of nitrogen removal: A review[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 293: 122086.
- [6] SAEED T, SUN G Z. A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media[J]. *Journal of Environmental Management*, 2012, 112: 429-448.
- [7] PHILIPPOT L. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, 2002, 1577: 355-376.
- [8] VYMAZAL J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands[J]. *Science of the Total Environment*, 2007, 380: 48-65.
- [9] LI Y, ZHU G, NG W J, et al. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands:

- Design, performance and mechanism[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 468: 908-932.
- [10] ZHI W, JI G. Quantitative response relationships between nitrogen transformation rates and nitrogen functional genes in a tidal flow constructed wetland under C/N ratio constraints[J]. *Water Research*, 2014, 64: 32-41.
- [11] LAI X S, ZHAO Y Q, PAN F X, et al. Enhanced optimal removal of nitrogen and organics from intermittently aerated vertical flow constructed wetlands: Relative COD/N ratios and microbial responses[J]. *Chemosphere*, 2020, 244: 125556.
- [12] CHEN D Y, GU X S, ZHU W Y, et al. Denitrification- and anammox-dominant simultaneous nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in subsurface flow constructed wetlands[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 271: 298-305.
- [13] HALLIN S, HELLMAN M, CHOUDHURY M I, et al. Relative importance of plant uptake and plant associated denitrification for removal of nitrogen from mine drainage in sub-arctic wetlands[J]. *Water Research*, 2015, 85: 377-383.
- [14] PAN J, QI S, SUN Y, et al. Nitrogen removal and nitrogen functional gene abundances in three subsurface wastewater infiltration systems under different modes of aeration and influent C/N ratios[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 241: 1162-1167.
- [15] LYU W, HUANG L, XIAO G, et al. Effects of carbon sources and COD/N ratio on N_2O emissions in subsurface flow constructed wetlands[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 171-181.
- [16] WU J, ZHANG J, JIA W, et al. Impact of COD/N ratio on nitrous oxide emission from microcosm wetlands and their performance in removing nitrogen from wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 2910-2917.
- [17] ZHAO Y, LIU B, ZHANG W, et al. Performance of pilot-scale vertical flow constructed wetlands in responding to variation in influent C/N ratios of simulated urban sewage[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 1693-1700.
- [18] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [19] TSUSHIMA I, KINDAICHI T, OKABE S. Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR[J]. *Water Research*, 2007, 41(4): 785-794.
- [20] JI G, ZHI W, TAN Y. Association of nitrogen micro-cycle functional genes in subsurface wastewater infiltration systems[J]. *Ecological Engineering*, 2012, 44: 269-277.
- [21] YAN T F, FIELDS M W, WU L Y, et al. Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments (*nirS* and *nirX*) from nitrate- and uranium-contaminated groundwater[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(1): 13-24.
- [22] THROBACK I N, ENWALL K, JARVIS A, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 49(3): 401-417.
- [23] SCALA D J and KERKHOF L J. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 162(1): 61-68.
- [24] CHEN X, ZHU H, YAN B, et al. Optimal influent COD/N ratio for obtaining low GHG emissions and high pollutant removal efficiency in constructed wetlands[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 267: 122003.
- [25] COSKUN D, BRITTO D T, SHI W, et al. How plant root exudates shape the nitrogen cycle[J]. *Trends in Plant Science*, 2017, 22: 661-673.
- [26] ZHAI X, PIWPUAN N, ARIAS C A, et al. Can root exudates from emergent wetland plants fuel denitrification in subsurface flow constructed wetland systems?[J]. *Ecological Engineering*, 2013, 61: 555-563.
- [27] FRANK D A and GROFFMAN P M. Plant rhizospheric N processes: What we don't know and why we should care[J]. *Ecology*, 2009, 90: 1512-1519.
- [28] WANG Q, XIE H J, NGO H H, et al. Microbial abundance and community in subsurface flow constructed wetland microcosms: Role of plant presence[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(5): 4036-4045.

- [29] LIU J, YIN 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.
- [30] ZHU H, YAN B, XU Y, et al. Removal of nitrogen and COD in horizontal subsurface flow constructed wetlands under different influent C/N ratios[J]. *Ecological Engineering*, 2014, 63: 58-63.
- [31] BRENZINGER K, DÖRSCH P, BRAKER G. pH-driven shifts in overall and transcriptionally active denitrifiers control gaseous product stoichiometry in growth experiments with extracted bacteria from soil[J]. *Frontier in Microbiology*, 2015, 6: 961.
- [32] LI H F, LIU F, LUO P, et al. Stimulation of optimized influent C:N ratios on nitrogen removal in surface flow constructed wetlands: Performance and microbial mechanisms[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 694: 133575.
- [33] GAO L, ZHOU W L, HUANG J C, et al. Nitrogen removal by the enhanced floating treatment wetlands from the secondary effluent[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 234: 243-252.
- [34] CHEN C, XU X J, XIE P, et al. Pyrosequencing reveals microbial community dynamics in integrated simultaneous desulfurization and denitrification process at different influent nitrate concentrations[J]. *Chemosphere*, 2017, 171: 294-301.

(责任编辑: 曲娜)

Influence of C/N ratio on the nitrogen removal and functional microbial abundance under aeration condition in horizontal subsurface flow constructed wetlands

PAN Fuxia^{1,*}, LAI Xiaoshuang², WANG Shuzhi², WANG Hui²

1. Institute of Environment and Ecology, Shandong Normal University, Jinan 250358, China

2. School of Water Conservancy and Environment, University of Jinan, Jinan 250022, China

*Corresponding author, E-mail: fxpan2020@163.com

Abstract To improve the removal efficiency of the low C/N ratio sewage by subsurface flow constructed wetland, the influences of C/N ratios (0.9:1, 2:1, 4:1) on the nitrogen removal rate, microbial community structure and functional microbial abundance under aeration condition in horizontal subsurface flow constructed wetlands at the vigorous stage of plant growth were studied. The results were as follows: the removal rate of NO_3^- was 57.48%~83.19%, and increased with the increase of C/N ratio. The removal rates of COD and TN increased as the C/N ratio increased to 2 and 4, and both of them were above 80%. The gene abundance of *nirK*, *nosZ* and anammox bacterial 16S rRNA of the treatments with C/N ratios of 2 and 4 were significantly higher than that of the treatment with low C/N ratio ($\text{C/N}=0.9$) ($P<0.05$); the gene abundance of *nxrA* decreased as the C/N ratio increased. The bacterial species number, Shannon-Wiener index, Simpson index and Chao1 index increased with the increase of C/N ratio. The *Proteobacteria* and *Acidobacteria* were the dominant bacteria in all treatments, which accounted for 62.89%~69.66% of the total bacteria sequences. Principle coordinate analysis of bacterial communities showed that there were huge differences of microbial community among the three treatments. Thus, adjusting the C/N ratio to 2 and 4 could improve the removal efficiency of the sewage in the horizontal subsurface flow constructed wetland during the vigorously stage of plant growth. Adding carbon source and changing aeration condition could change the functional gene abundance and microbial community structure in the substrate to improve the removal efficiency of contaminants.

Keywords nitrogen removal efficiency; aeration; low C/N sewage; functional gene abundance; microbial community structure