

# 人工湿地净化海水养殖外排水效果 与微生物群落分析\*

王加鹏<sup>1,2</sup> 崔正国<sup>2①</sup> 周 强<sup>1,2</sup> 马绍赛<sup>2</sup> 曲克明<sup>2</sup> 毛成全<sup>3</sup>

(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** 利用实验室规模的复合垂直流人工湿地系统来处理海水养殖外排水,探讨了人工湿地对外排水中主要污染物指标氨氮、磷酸盐和 COD 的去除效果,并利用变形梯度凝胶电泳技术(DGGE)分析了人工湿地内部微生物的群落组成和结构特点。结果显示,人工湿地对海水养殖外排水中的氨氮、磷酸盐和 COD 去除效果显著,平均去除率分别为(92.82±3.27)%、(72.53±2.31)%、(66.04±8.23)%;人工湿地系统内微生物组成较为丰富,且不同位置存在着种属相同、数量不同的生态幅广泛的优势种;人工湿地下行流池微生物多样性指数( $H'$ )比上行流池高,且沿水流方向呈下降趋势;人工湿地系统中距离越远相似性系数越小;海水养殖外排水人工湿地处理系统微生物种群包括变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)和厚壁菌门(Firmicutes),其中,主要的优势菌群属于变形菌门和拟杆菌门。

**关键词** 人工湿地; 微生物; 海水养殖外排水; 净化效果; PCR-DGGE 技术

**中图分类号** X714 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0001-09

人工湿地污水处理系统源于对自然湿地的模拟,它利用基质、植物和微生物构成的复合系统通过物理、化学和生物三重协同作用来实现对污水的净化作用(王世和, 2007)。由于人工湿地净水技术具有处理效果好、投入少、能耗小、管理方便、生态效益显著的优点,目前已被广泛应用于处理生活污水(宣亚红等, 2008; Kivaisi, 2001)、工业废水(籍国东等, 2002; Comin *et al*, 1997)、农业污水(Rivera *et al*, 1997)、养殖废水(于涛等, 2008)等各种类型的污水,但在处理海水养殖外排水方面的研究较为少见。微生物在净水方面发挥着至关重要的作用。一方面,微生物可直接同化吸收污水中的营养物质供自身生长需要;另一方面,微生物充当着多种营养物质形态转化和矿化的主要执行者的角色(黄德锋等, 2007; Dong *et al*, 2010)。

因此,了解人工湿地中微生物群落的结构组成和分布状况,对深入理解人工湿地系统中污染物的去除机理具有重要意义。

现代分子生物学技术 PCR-DGGE 是一种分析微生物群落的有效工具。PCR-DGGE 技术将 PCR 扩增(聚合酶链式反应)和 DGGE(变性梯度凝胶电泳)结合,利用不同 DNA 片段的溶解性质不同,在胶中不同位置解链分离的原理,在分子生物学方面表征微生物群落的结构组成及分布状况。相对于稀释平板、MPN 等传统的微生物分离培养法,PCR-DGGE 技术具有快速、准确、客观的优点,能更好的反映微生物的种群结构(周元清等, 2011; Ferris *et al*, 1996; 朱砺之等, 2012)。作者在研究海水养殖外排水人工湿地处理系统中氮、磷和 COD 去除效果的基础上,采

\* 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。王加鹏, E-mail: wjpeng1989@126.com

① 通讯作者: 崔正国, 副研究员, E-mail: cuizg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-01-01, 收修改稿日期: 2014-03-24

用 PCR-DGGE 技术分析了系统内微生物群落的结构组成、立体分布状况,以期探讨人工湿地中微生物的净化机制奠定理论基础。

## 1 试验装置与材料

构建了实验室规模的复合垂直流人工湿地系统(图1)。人工湿地装置由 PVC 材料制作,主要包括下行流池和上行流池,长 60 cm、宽 40 cm、高 70 cm,出

水口比进水口低 10 cm。综合考虑对污染物的去除效果、可能引起的堵塞问题及材料价格因素,选用了表面粗糙、粒径较大的珊瑚石和煤渣作为人工湿地基质。装置自下而上依次填充了粒径依次减小的珊瑚石(粒径 3–5 cm)、煤渣(粒径 2–4 cm)和珊瑚石(粒径 0–3 cm)。人工湿地植物为耐盐碱、耐潮汐淹没、繁殖力强、根系发达的互花米草(肖强等,2005),采自烟台海阳市某海区滩涂,种植密度约为 64 株/m<sup>2</sup>。

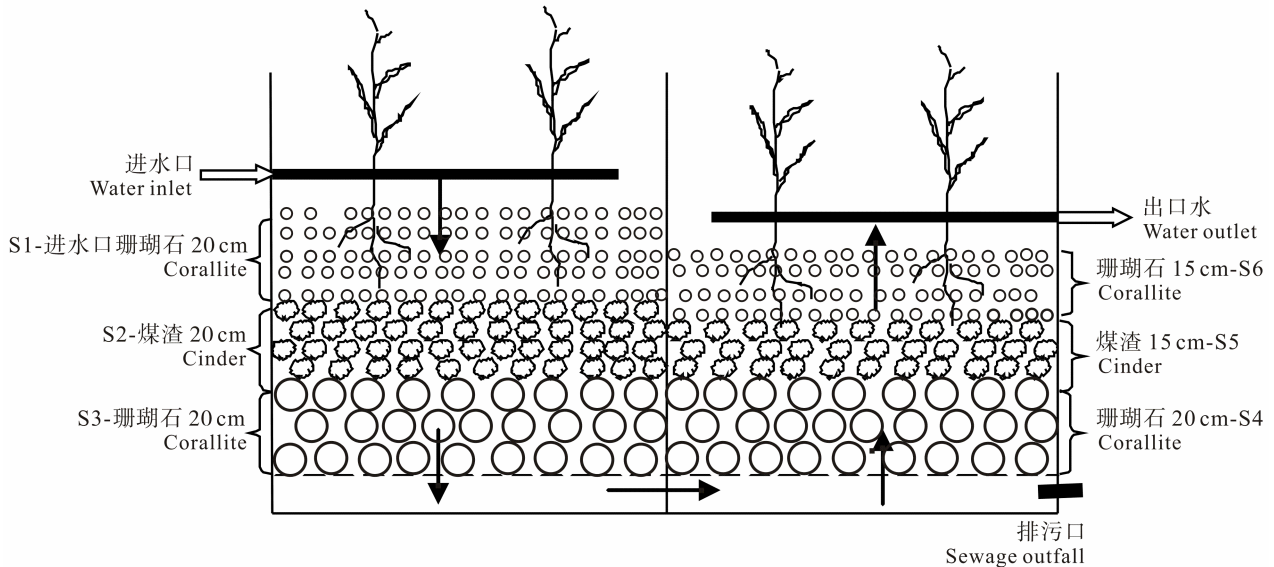


图1 复合垂直流人工湿地系统

Fig.1 Constructed integrated vertical flow wetland

## 2 试验方法

### 2.1 人工湿地净化海水养殖外排水效果

**2.1.1 试验设计** 人工湿地处理的海水养殖外排水系人工配制,主要由海水、粉碎的饵料添加适量氯化铵、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾和葡萄糖混合配置而成。主要水质指标为:氨氮为 0.29–0.35 mg/L;磷酸盐为 0.60–0.70 mg/L;COD 为 7.38–9.42 mg/L。在研究期间,出水理化指标波动范围为:温度为 27.68–29.62℃,平均为(28.70±0.72)℃;盐度为 31.30–33.07,平均为 32.38±0.67; pH 为 7.46–7.67,平均为 7.62±0.03;DO 为 1.67–3.00 mg/L,平均为(2.32±0.61) mg/L。人工配置的模拟海水养殖外排水由人工湿地装置进水口进入,先后经过下行流池和上行流池后依靠重力作用由出水口流出,收集后再经水泵提升进入装置进行循环处理,日循环为 8–10 个量程,水力停留时间约为 1.5 h。装置预运行 60 d 达到稳定后,以 7–8 d 为一循环周期,进行了 5 个周期的处理,期间每天监

测出水各水质指标的变化情况。

**2.1.2 水质监测方法及数据分析** 依据《海洋监测规范》(GB 12763.4-2007)进行水质指标的检测。氨氮:次溴酸盐氧化法;磷酸盐:磷钼蓝分光光度法;COD:碱性高锰酸钾法。温度、盐度、pH、DO 采用 YSI 多参数水质分析仪进行测定。用 Origin 8.0 软件进行作图和数据分析。

### 2.2 人工湿地基质的 PCR-DGGE 分析

**2.2.1 样品采集** 在人工湿地系统净化海水养殖外排水效果试验后,采集系统基质进行 PCR-DGGE 分析,以探究人工湿地内部的微生物群落结构组成及其演替变化情况。从图 1 可以看出,采集下行流池的表层(0–20 cm,样品编号 S1)、中层(20–40 cm,样品编号 S2)、底层(40–60 cm,样品编号 S3)和上行流池的底层(30–50 cm,样品编号 S4)、中层(15–30 cm,样品编号 S5)、表层(0–15 cm,样品编号 S6),采集的各层样品充分混匀。在进行 PCR-DGGE 分析之前,

各层样品置于-20℃的冰箱中贮存。

**2.2.2 样品 DNA 的提取与纯化** 采集的样品置于灭菌后的锥形瓶中, 加入 200 ml 灭菌后的蒸馏水, 超声波清洗 10 min, 恒温振荡器以 120 r/min 振荡 30 min, 取悬浮液在 8000 r/min 下离心 10 min, 弃上清液, 收集沉淀用于 DNA 提取。DNA 提取采用 CTAB 法, 具体方法参照赵兴青等(2006)、Miller 等(1999)文献进行。采用北京天根生化科技有限公司生产的试剂盒对 DNA 粗提取液进行了纯化。

**2.2.3 PCR 扩增** 以样品基因组 DNA 为模板, 采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R(表 1)扩增样品 16S rDNA 高变区序列, 其中 PCR 扩增仪为德国 Biometra 公司生产的 T-gradient 梯度 PCR 仪, 凝胶成像仪为美国 Bio-Rad 公司生产的 Gel-Doc 2000 凝胶成像系统, PCR 产物采用 OMEGA 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收。

表 1 引物信息  
Tab.1 PCR primers

引物 Primer	序列 Sequence
338F	CCT ACG GGA GGC AGC AG
518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG
GC338F	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGGGCGGG GGCGCGGGGG CCT ACG GGA GGC AGC AG

PCR 扩增体系(50 μl): 10× PCR Buffer 5 μl; dNTP(2.5 mmol/L) 3.2 μl; rTaq(5 U/μl) 0.4 μl; GC-338F(20 mmol/L) 1 μl; 518R(20 mmol/L) 1 μl; 模板 DNA 50 ng; 补 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μl。

PCR 扩增程序: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 55℃复性 45 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环; 最终 72℃延伸 10 min。

**2.2.4 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析**

取 10 μl 扩增后的 PCR 产物进行变形梯度凝胶电泳(DGGE)分析。采用变形梯度为 35%–55%、浓度为 8%的聚丙烯酰胺凝胶(100%化学变性剂中含有尿素 7 mol/L 和 40%的丙烯酰胺)在 1×TAE 缓冲液中 150 V、60℃恒温恒压下电泳 5 h。

变形梯度凝胶电泳(DGGE)完毕后, 采用银染法对凝胶进行染色, 染色完成后, 利用 Gel-Doc2000 凝胶成像系统进行成像观察、拍照。利用软件 Quantity one 分析图谱。

**2.2.5 DGGE 图谱中优势条带的回收与测序** 用灭菌的手术刀切下待回收的 DGGE 条带, 采用 OMEGA 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收目的条带。然后以 2 μl 回收产物为模板, 338F/518R 为引

物进行 PCR 扩增。

PCR 扩增体系(50 μl): 10× PCR Buffer 5 μl; dNTP(2.5 mmol/L) 3.2 μl; rTaq(5 U/μl) 0.4 μl; 338F (20 mmol/L) 1 μl; 518R(20 mmol/L) 1 μl; 模板 DNA 1 μl; 补 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μl。

PCR 扩增程序: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 30 s, 55℃复性 30 s, 72℃延伸 30 s, 30 个循环; 最后, 72℃延伸 10 min。

将重新扩增的 DNA 片段切胶回收、纯化后, 连接到 pMD18-T 载体上, 并转化至 DH5α 感受态细胞中, 筛选阳性克隆, 进行序列测定。将所测条带的序列在 GenBank 数据库中用 Blast 进行检索分析。

**2.2.6 数据分析** DGGE 图谱采用 Quantity one 软件对每个样品的电泳条带数目、条带密度进行数字化分析。由(1)式计算每个样品中的微生物多样性指数  $H'$ (Shannon-Wiener 指数), 由(2)式计算各个样品间的相似性系数  $C_s$ (Dice coefficient):

$$H' = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i = -\sum_{i=1}^S (N_i / N) \ln(N_i / N) \quad (1)$$

式中,  $p_i$  为样品中单一条带的强度在该样品所有条带总强度中所占的比率,  $N$  为泳道中所有条带的光密度和,  $N_i$  为第  $i$  个条带的光密度值。  $S$  是某样品中所有条带数目的总和。

$$C_{sAB} = 2L_{AB} / (L_A + L_B) \times 100 \quad (2)$$

式中,  $C_{sAB}$  为泳道 A 和泳道 B 之间的相似性系数;  $L_{AB}$  为泳道 A 与泳道 B 上位置相同的条带数;  $L_A$  为泳道 A 上的条带数;  $L_B$  为泳道 B 上的条带数。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 人工湿地处理海水养殖外排水效果

氮在人工湿地中存在 7 种价态的多种转换, 其迁移和转化过程复杂, 涉及的主要机理有基质吸附、植物吸收、氨的挥发作用、氮的固定、氨化、埋藏及微生物的硝化反硝化作用等(Reddy *et al*, 1997; Sun *et al*, 2007; Tanner *et al*, 2002; Vymazal *et al*, 2007)。人工湿地对氨氮的去除主要是通过微生物的作用, 少部分是通过植物同化吸收、基质吸附作用去除。有机氮可通过微生物的氨化作用转化为氨氮, 氨氮再经硝化作用转化为硝态氮, 硝态氮进一步被反硝化细菌通过反硝化作用还原成气态氮从系统中去除(周群英等, 2000)。本研究运行期间, 进水氨氮浓度范围为 0.29–0.35 mg/L, 平均为(0.33±0.03) mg/L; 在处理 6 d 之后, 出水氨氮浓度基本达到稳定, 范围为 0.008–0.04 mg/L, 平均为

( $0.02 \pm 0.01$ ) mg/L; 去除率范围为 87.61%–97.76%, 平均为( $92.82 \pm 3.27$ )%(图 2), 去除效果极佳。

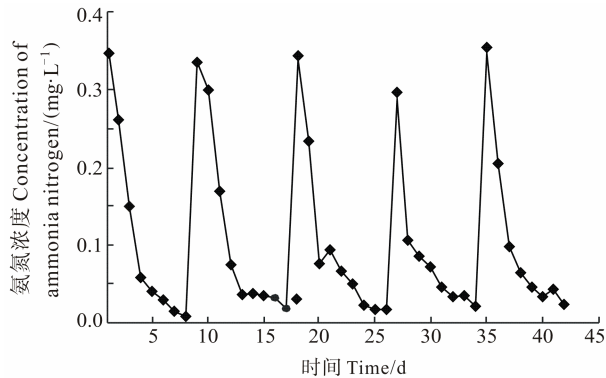


图 2 人工湿地对氨氮净化效果

Fig.2 Effects of the constructed wetland on the removal of ammonia nitrogen

人工湿地对磷的去除主要通过基质吸附沉降、植物同化吸收和微生物降解 3 条途径, 其中基质的吸附和沉降是最主要途径, 70%–87%的磷都是通过这种途径去除的(夏宏生等, 2005; Reddy *et al.*, 1998)。不同的基质对磷的吸附能力不同, 基质含有的  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  等金属离子也可与磷酸盐发生化学沉淀作用而将其去除(Al-Omari *et al.*, 2003)。本研究采用对磷酸盐有很好的吸附效果的煤渣(Sakadevan *et al.*, 1998)和含有丰富钙质的珊瑚石作为基质, 显示出很好的去除效果。研究期间, 进水磷酸盐浓度范围为 0.60–0.70 mg/L, 平均为( $0.65 \pm 0.05$ ) mg/L; 每天出水磷酸盐浓度范围为 0.14–0.24 mg/L, 平均为( $0.18 \pm 0.02$ ) mg/L; 去除率范围为 65.74%–75.98%, 平均为( $72.53 \pm 2.31$ )%(图 3)。有研究表明(Yli-Halla *et al.*, 1995; 赵海洋等, 2006), 土壤对磷的作用过程中存在着吸附–解吸平衡点( $\text{EPC}_0$ ), 若水中的磷酸盐浓度高于  $\text{EPC}_0$ , 土壤会

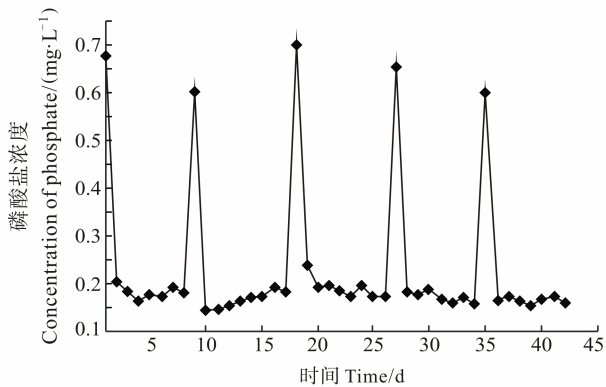


图 3 人工湿地对磷酸盐净化效果

Fig.3 Effects of the constructed wetland on the removal of phosphate

吸附水中的磷; 反之, 土壤则释放磷。因此, 土壤对磷的吸附–解吸是一个动态平衡过程。本研究中人工湿地装置出水磷酸盐浓度稳定在 0.2 mg/L 左右, 可能是人工湿地基质与处理水之间的磷酸盐浓度达到动态平衡状态, 基质无法再吸附沉降水中的磷酸盐。

COD 是衡量水体中好氧有机物多少的一个重要指标, 可直接反映水体的受污染程度(雷衍之等, 2004; 过锋等, 2012; 陈芳等, 2013)。人工湿地对有机物具有较好的去除效果, 水体中的不溶性有机物可通过湿地中基质的过滤沉淀而被截留下来, 进而被部分兼性或厌氧微生物利用; 可溶性有机物则通过基质和植物根系表面形成的生物膜吸附、分解及代谢作用去除(王晖文等, 2010; Zhu *et al.*, 1995)。故微生物的代谢作用是人工湿地去除水体中有机物的主要机制。在本研究期间, 进水 COD 浓度范围为 7.38–9.42 mg/L, 平均为( $8.41 \pm 0.80$ ) mg/L; 每天出水 COD 浓度范围为 1.83–4.78 mg/L, 平均为( $2.86 \pm 0.73$ ) mg/L; 去除率范围为 40.84%–77.63%, 平均为( $66.04 \pm 8.23$ )%。出水 COD 平均浓度小于 3 mg/L, 达到第二类海水水质标准(图 4)。

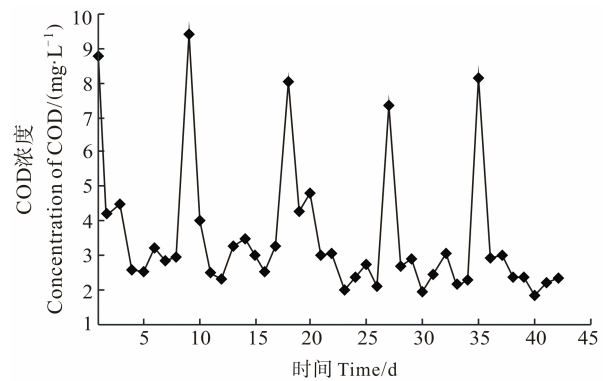


图 4 人工湿地对 COD 净化效果

Fig.4 Effects of the constructed wetland on the removal of COD

### 3.2 人工湿地基质的 PCR-DGGE 分析

**3.2.1 细菌的 16S rDNA V3 区 PCR 扩增** 以样品基因组 DNA 为模板, 采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R 扩增样品 16S rDNA 高变区序列, 得到长度约为 230 bp 的 DNA 片段。从图 5 可以看出, 6 个样品均已扩出, 未出现非特异性扩增, 且阴性对照未有产物出现, 表明 PCR 扩增效果良好。

**3.2.2 微生物 DGGE 指纹图谱分析** 各样品细菌 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增产物经变性梯度凝胶电泳后, 获得较为清晰的 DGGE 分离图谱(图 6)。DGGE 图谱中条带数越多说明生物多样性越丰富, 条带染色后的荧光强度则反映该细菌的丰富度, 条带信号越

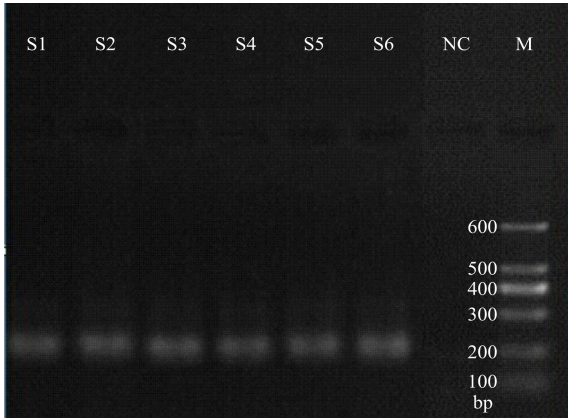


图 5 PCR 扩增产物凝胶电泳图像

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of PCR products  
M: 100–600 bp DNA ladder; Nc: 阴性对照 Negative control

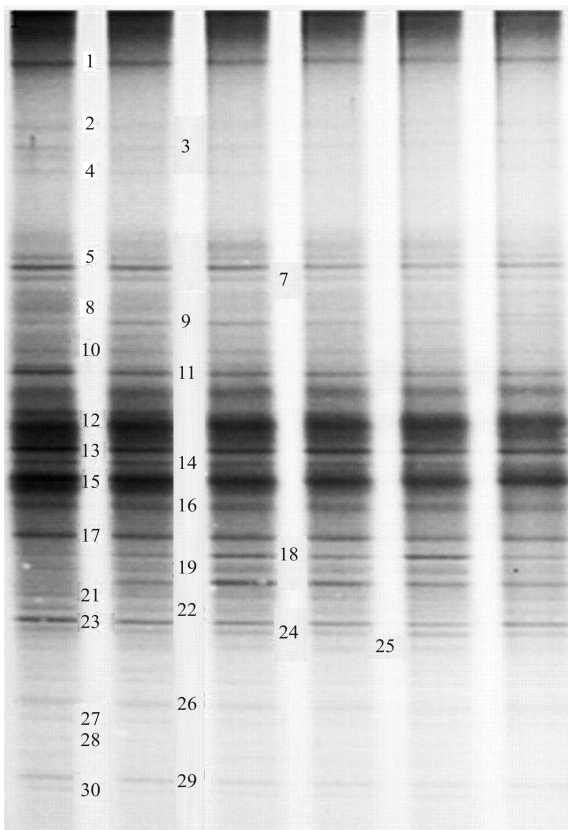


图 6 各样品的 DGGE 凝胶电泳图谱

Fig.6 DGGE fingerprints of different samples

亮, 表示该种属的数量越多(赵兴青等, 2006)。本研究人工湿地基质样品中约有 30 条条带, 并且有几个条带信号较强, 表明人工湿地内部的微生物群落组成较为丰富。条带 1、6、11、12、13、15、16、17、23 在各个样品中都存在, 并且信号较强, 表明人工湿地中存在着优势微生物种群, 这些细菌的生态幅较广, 对环境变化的适应性比较强, 在湿地系统的不同位置

均能稳定存在(黄德锋等, 2007), 只是由于外界营养盐水平和环境条件的不同, 在数量上有所差异。条带 18、20 在样品 S3、S4、S5 中属于数量较多的优势种群, 在其他样品中含量相对较少, 可能与这几个样品位于人工湿地底部而产生的独特的厌氧环境有关。另外, 各个样品并没有产生自己的特有种群, 可能与本研究水处理方式为循环处理有关。

**3.2.3 微生物多样性和相似性分析** 不同深度基质样品的细菌群落多样性指数  $H'$  按照式(1)计算后结果见图 7, 各样品的微生物多样性指数都在 2.8 以上。从图 7 可以看出, 下行流池样品(S1、S2、S3)的  $H'$  值要明显高于上行流池(S4、S5、S6)样品, 主要是由于处理水首先经过下行流池的处理, 再进入上行流池, 而人工湿地对污染物的去除主要发生在下行流(袁林江等, 2008), 进入上行流池的处理水营养盐浓度较下行流池已经显著降低, DO 也由于沿程的消耗而降低, 导致下行流池的条件较上行流池更适于微生物的生长。各样品中, 又以下行流池表层 S1 的  $H'$  值最高, 达到了 3.177, 沿程逐渐下降, 至上行流池中层 S5 达到  $H'$  值最低, 仅为 2.804, 上行流池表层 S6 又升至 2.902。虽然处理水流至 S6 层, 碳源、氮源、磷源等营养盐浓度已逐步减少, 但 S6 层有大量的植物根系, 根际效应、植物供氧、植物枯枝落叶的积累以及更接近外界环境产生的复氧作用, 使样品 S6 的微生物多样性指数反而比样品 S5 高。

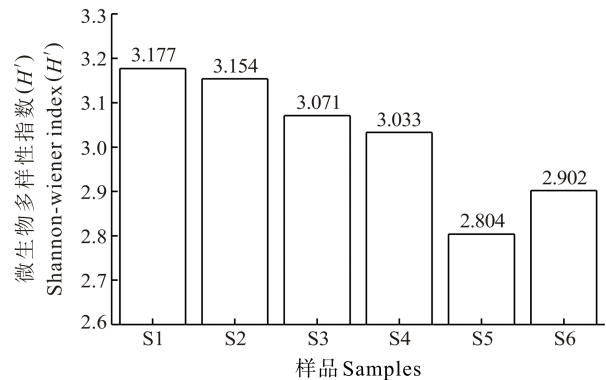


图 7 各样品的微生物多样性指数( $H'$ )

Fig.7 Diversity index of microbial communities in different samples

表 2 为根据式(2)所计算的各样品间的微生物群落相似性系数( $C_s$ )。从表 2 可以看出, 各样品间的相似性系数不同, 总体上呈现出各样品沿水流方向相距越远,  $C_s$  越小的趋势。样品 S2、S3、S4、S5、S6 之间的相似性系数较高, 都在 80%以上。而样品 S1 与后 5 个样品之间  $C_s$  相对较低, 并且沿水流方向随

表2 各样品间的微生物群落相似性系数( $C_s$ , %)  
Tab.2 Comparability index of microbial communities in different samples (%)

样品 Samples	S1	S2	S3	S4	S5	S6
S1	100	79.6	78.4	76.6	65.1	69.9
S2	79.6	100	90.1	86.0	81.1	81.1
S3	78.4	90.1	100	89.4	83.5	84.0
S4	76.6	86.0	89.4	100	85.1	88.5
S5	65.1	81.1	83.5	85.1	100	83.6
S6	69.9	81.1	84.0	88.5	83.6	100

距离的增大减小趋势明显,与样品 S5 的  $C_s$  只有 65.1%,与 S6 的  $C_s$  又升高到 69.9%,这与两个样品同为植物根部区域有关。人工湿地不同的位置营养水

平和周围的理化条件不同,形成了各自的“小环境”,各自的“小环境”又适宜不同的微生物群落生长,产生不同的优势菌群,所以导致各样品间的  $C_s$  不同。另外,本研究中各样品间的平均  $C_s$  达到了 81.47%,远大于黄德锋等(2007)的 64.43%,这与本研究的水处理方式有关。

**3.2.4 DGGE 条带基因片段的测序分析** 将图 6 中所标记的 30 条条带进行切胶回收、测序后,在 GenBank 数据库中进行比对,比对结果见表 3。从表 3 可以看出,30 条条带所含的 DNA 序列与 GenBank 中的已知序列具有较高的相似度,都在 98%以上,可以认为是同一种。比对结果表明,30 条条带中有 9 个属于变形菌门(Proteobacteria),占 30%,其中  $\gamma$ -变形菌

表3 测序序列与其 GenBank 比对结果  
Tab.3 The comparison of the results of sequence and GenBank

条带 Band	相似菌(登录号)Closest relative bacteria(Accession number)	相似度 Similarity(%)	分类 Classification
1	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium(JX844001)	98	<i>Bacteroidetes</i>
2	Uncultured bacterium clone(U775370)	100	Environmental samples
3	<i>Flavobacterium</i> sp. KN6(HQ231950)	99	<i>Bacteroidetes</i>
4	<i>Flavobacterium</i> sp. H43(HM209363)	99	<i>Bacteroidetes</i>
5	Uncultured bacterium clone(JF745519)	100	Environmental samples
6	Uncultured bacterium clone(EU802122)	99	Environmental samples
7	Uncultured Nitrospirae bacterium(F183020)	99	Nitrospirae
8	Microbacteriaceae bacterium MS244c(JN616364)	100	<i>Actinobacteria</i>
9	<i>Microbacterium</i> sp. Y7(F192059)	99	<i>Actinobacteria</i>
10	<i>Marinobacterium</i> sp. 08XMAC-12(HM565972)	99	$\gamma$ -Proteobacteria
11	Uncultured <i>Flectobacillus</i> sp.( HQ111157)	100	<i>Bacteroidetes</i>
12	Uncultured bacterium(J534960)	98	Environmental samples
13	<i>Flavobacterium</i> sp. AcJ(KC853132)	100	<i>Bacteroidetes</i>
14	Uncultured <i>delta proteobacterium</i> (F344084)	99	$\delta$ -Proteobacteria
15	<i>Bdellovibrio</i> sp. N322(KC836746)	99	$\delta$ -Proteobacteria
16	Uncultured Methylobacteriaceae bacterium(JX575912)	100	$\alpha$ -Proteobacteria
17	<i>Acinetobacter</i> sp. P4C7(HF936888)	100	$\gamma$ -Proteobacteria
18	<i>Alpha proteobacterium</i> 2715(B498881)	100	$\alpha$ -Proteobacteria
19	<i>Glaciecola</i> sp. KJF8-12(Q800127)	100	$\gamma$ -Proteobacteria
20	<i>Alteromonadales</i> bacterium(AM931132)	100	$\gamma$ -Proteobacteria
21	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium(JN371677)	99	<i>Firmicutes</i>
22	Uncultured <i>actino bacterium</i> (GQ242437)	99	<i>Actinobacteria</i>
23	Uncultured bacterium(KC787589)	100	Environmental samples
24	<i>Arthrobacter</i> sp. LT37(KF202856)	100	<i>Actinobacteria</i>
25	Uncultured <i>Verrucomicrobia</i> bacterium(EF188433)	99	<i>Verrucomicrobia</i>
26	Uncultured <i>actino bacterium</i> (EF471555)	99	<i>Actinobacteria</i>
27	Uncultured bacterium(JQ769588)	99	Environmental samples
28	Uncultured <i>Verrucomicrobia</i> bacterium(EF188433)	99	<i>Verrucomicrobia</i>
29	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium(KC917939)	100	$\alpha$ -Proteobacteria
30	Uncultured bacterium(FJ645555)	100	Environmental samples

纲( $\gamma$ -Proteobacteria) 4 个,  $\alpha$ -变形菌纲( $\alpha$ -Proteobacteria) 3 个,  $\delta$ -变形菌纲( $\delta$ -Proteobacteria) 2 个; 5 个属于拟杆菌门(Bacteroidetes), 占 16.7%; 5 个放线菌门(Actinobacteria), 占 16.7%; 2 个疣微菌门 (Verrucomicrobia), 占 6.7%; 1 个厚壁菌门(Firmicutes), 占 3.3%; 1 个硝化螺旋菌门(Nitrospirae), 占 3.3%; 7 个已被收录的环境样品的未知种群(Environmental samples), 占 23.3%。大部分(18 个, 占 60%)为不可培养的(Uncultured)细菌。信号较强的条带 1、6、11、12、13、15、16、17、23 中, 条带 6、12、23 属于环境样品的未知种群, 条带 1、11、13 属于拟杆菌门, 条带 15、16、17 属于变形菌门。

变形菌门在很多环境的调查中都是主要的微生物类群(罗鹏等, 2009; O'Sullivan *et al*, 2002)。在本研究的人工湿地内部高盐度环境下, 变形菌门也是主要的微生物类群, 其中偏好于高营养盐环境, 并且易于吸收低分子量的溶解性有机物的  $\gamma$ -变形菌纲(张海耿等, 2012; Naganuma *et al*, 2000)所占比例最大。5 个拟杆菌门中有 3 个是黄杆菌属(*Flavobacterium*), 在低氧或无氧条件下, 它们能利用硝酸盐或亚硝酸盐作为最终电子受体进行无氧呼吸, 同时有机物被氧化(朱砾之等, 2012), 这说明人工湿地内部存在着反硝化作用。放线菌门所占比例也较大, 但放线菌在碳氮源物质循环、能量流动等生态学方面的研究相当滞后, 有待进一步研究(田新朋等, 2011)。另外, 在样品中检测到了属于硝化螺旋菌门的微生物种群。近几年研究表明, 在硝化过程中, 真正起亚硝酸盐氧化作用的可能是硝化螺旋菌属的细菌, 而不是变形菌门的硝化杆菌属(*Nitrobacter*)这一传统硝化菌属的菌种(钦颖英等, 2007; Burrell *et al*, 1999; Lee *et al*, 2002)。

本研究系海水体系人工湿地, 微生物优势种属有拟杆菌门的弯杆菌属(*Flectobacillus* sp.)、黄杆菌属(*Flavobacterium* sp.)和变形菌门的蛭弧菌属(*Bdellovibrio* sp.)、甲基杆菌(*Methylobacteriaceae*)、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)。Calheiros 等(2010)利用 PCR-DGGE 技术, 分析了处理高盐度制革废水人工湿地的微生物群落组成, 发现主要细菌群落有厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门和变形菌门。淡水体系人工湿地中, Calheiros 等(2009)研究表明, 芦苇湿地主要微生物群落有  $\gamma$ -变形菌、鞘脂杆菌门(Sphingobacteria)、放线菌门和拟杆菌门; Dong 等(2010)利用 PCR-DGGE 技术得出处理畜牧业废水的人工湿地微生物优势种属为  $\gamma$ -变形菌纲( $\gamma$ -Proteobacteria)的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、放线菌门的节细菌属(*Arthrobacter* sp.)、

厚壁菌门的芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。人工湿地内部微生物受湿地类型、湿地植物和基质的组成、运行方式、理化条件、季节等各方面因素的综合影响, 表现出不同的组成和结构特点。

## 4 结论

(1) 人工湿地循环处理模拟海水养殖外排水效果显著, 对主要的污染物指标氨氮、磷酸盐和 COD 都显现出了较高的处理效果, 平均去除率分别达到了(92.82 $\pm$ 3.27)%、(72.53 $\pm$ 2.31)%和(66.04 $\pm$ 8.23)%。

(2) PCR-DGGE 图谱表明, 在盐胁迫条件下, 人工湿地内部的微生物群落组成较为丰富, 并且在不同位置都存在着一些种属相同、数量不同的生态幅广泛的优势种。

(3) 由于营养水平与环境条件的不同, 人工湿地内部不同位置的生物多样性指数( $H'$ )与相似性系数( $C_s$ )也不同。人工湿地下行流池微生物多样性指数要高于上行流池, 并且沿水流方向呈下降趋势; 人工湿地系统中各样品微生物相似性系数( $C_s$ )与样品位置存在一定关系, 沿着水流方向样品距离越远, 相似性系数越小。

(4) 海水养殖外排水人工湿地处理系统中微生物种群分布较为广泛, 与 GenBank 对应的已知微生物种群有变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、疣微菌门、硝化螺旋菌门和厚壁菌门, 其中, 主要的优势菌群属于变形菌门和拟杆菌门。这些微生物种群参与了人工湿地对污染物的去除过程, 并且起到了非常重要的作用。

## 参 考 文 献

- 于涛, 成水平, 贺锋, 等. 基于复合垂直流人工湿地的循环水养殖系统净化养殖效能与参数优化. 农业工程学报, 2008, 24(2): 188-194
- 王世和. 人工湿地污水处理理论与技术. 北京: 科学出版社, 2000, 1-2
- 王晖文, 韩会玲. 人工湿地污水净化处理研究. 安徽农业科学, 2010, 38(1): 163-164, 167
- 田新朋, 张懿, 李文均. 海洋放线菌研究进展. 微生物学报, 2011, 51(2): 161-169
- 过锋, 赵俊, 陈聚法, 等. 胶州湾贝类养殖区氮、磷污染现状及动态变化. 渔业科学进展, 2012, 33(5): 116-122
- 朱砾之, 黄娟, 傅大放, 等. 人工湿地生态系统中的微生物作用及 PCR-DGGE 技术的应用. 安全与环境工程, 2012, 19(2): 26-30
- 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, 52

- 肖强, 郑海雷, 陈瑶, 等. 盐度对互花米草生长及脯氨酸、可溶性糖和蛋白质含量的影响. *生态学杂志*, 2005, 24(4): 373-376
- 陈芳, 包慧娟. 崂山水库污染源评价分析及治理对策. *渔业科学进展*, 2013, 34(4): 104-108
- 周元清, 李秀珍, 李淑英, 等. 不同类型人工湿地微生物群落的研究进展. *生态学杂志*, 2011, 30(6): 1251-1257
- 周群英, 高廷耀. *环境工程微生物学*. 北京: 高等教育出版社, 2000, 45-50
- 罗鹏, 胡超群, 张吕平, 等. 凡纳滨对虾海水养殖系统内细菌群落的 PCR-DGGE 分析. *中国水产科学*, 2009, 16(1): 31-38
- 宣亚红, 王小江, 白玉华, 等. 垂直流人工湿地系统在城市生活小区污水处理和回用中的应用. *上海水务*, 2008, 24(3): 34-36
- 赵兴青, 杨柳燕, 陈灿, 等. PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究. *生态学报*, 2006, 26(11): 3610-3616
- 赵海洋, 王国平, 刘景双, 等. 三江平原湿地土壤磷的吸附与解吸研究. *生态环境*, 2006, 15(5): 930-935
- 钦颖英, 李道棠, 杨虹. 给水生物预处理反应器的细菌种群多样性和群落结构. *应用与环境生物学报*, 2007, 13(1): 104-107
- 夏宏生, 汤兵. 人工湿地除磷技术. *四川环境*, 2005, 24(1): 83-86, 123
- 袁林江, 韩瑞瑞, 韩玮. 间歇进水复合垂直流人工湿地的净化特性研究. *西安建筑科技大学学报(自然科学版)*, 2008, 40(4): 521-526
- 黄德锋, 李田, 陆斌. 复合垂直流人工湿地污染物去除及微生物群落结构的 PCR-DGGE 分析. *环境科学研究*, 2007, 20(6): 137-141
- 雷衍之. *养殖水环境化学*. 北京: 中国农业出版社, 2004, 76-78
- 籍国东, 孙铁珩, 李顺. 人工湿地及其在工业废水处理中的应用. *应用生态学报*, 2002, 13(2): 224-228
- Al-Omari A, Fayyad M. Treatment of domestic wastewater by subsurface flow constructed wetlands in Jordan. *Desalination*, 2003, 155(1): 27-39
- Burrell P, Keller J, Blackall LL. Characterization of the bacterial consortium involved in nitrite oxidation in activated sludge. *Water Sci Technol*, 1999, 39(6): 45-52
- Calheiros CSC, Duque AF, Moura A, *et al.* Changes in the bacterial community structure in two-stage constructed wetlands with different plants for industrial wastewater treatment. *Bioresour Technol*, 2009, 100(13): 3228-3235
- Calheiros CSC, Teixeira A, Pires C, *et al.* Bacterial community dynamics in horizontal flow constructed wetlands with different plants for high salinity industrial wastewater polishing. *Water Res*, 2010, 44(17): 5032-5038
- Comin FA, Romero JA, Astorga V, *et al.* Nitrogen removal and cycling in restored wetlands used as filters of nutrients for agricultural runoff. *Water Sci Technol*, 1997, 35(5): 255-261
- Dong XL, Reddy GB. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. *Bioresour Technol*, 2010, 101(4): 1175-1182
- Ferris MJ, Muyzer G, Ward DM. Denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(2): 340-346
- Kivaisi AK. The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review. *Ecol Eng*, 2001, 16(4): 545-560
- Lee HW, Lee SY, Lee JW, *et al.* Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, 41(2): 85-94
- Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, *et al.* Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(11): 4715-4724
- Naganuma T, Fukai I, Murakami Y, *et al.* Effect of ultraviolet radiation on the bioavailability of marine diatom-derived low-molecular-weight dissolved organic matter. *Aquatic Ecosystem Health Management*, 2000, 3(1): 163-166
- O'Sullivan LA, Weightman AJ, Fry JC. New degenerate Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(1): 201-210
- Reddy KR, Connor GA, Gale PM. Phosphorus sorption capacities of wetland soils and stream sediments impacted by dairy effluent. *J Environ Qual*, 1998, 27(2): 438-447
- Reddy KR, D'Angelo EM. Biogeochemical indicators to evaluate pollution removal efficiency in constructed wetlands. *Water Sci Technol*, 1997, 35(5): 1-10
- Rivera R, Warren A, Curds CR, *et al.* The application of the root zone method for the treatment and reuse of highstrength abattoir waste in Mexico. *Water Sci Technol*, 1997, 35: 271-278
- Sakadevan K, Bavor HJ. Phosphate adsorption characteristics of soils, slags and zeolite to be used as substrates in constructed wetland systems. *Water Res*, 1998, 32(2): 393-399
- Sun GZ, Austin D. Completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite in lab-scale constructed wetlands: evidence from a mass balance study. *Chemosphere*, 2007, 68(6): 1120-1128
- Tanner CC, Kadlec RH, Gibbs MM, *et al.* Nitrogen processing gradients in subsurface-flow treatment wetlands. *Ecol Eng*, 2002, 18: 499-520
- Vymazal J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Sci Total Environ*, 2007, 380(1-3): 48-65
- Yli-Halla M, Hartikainen H, Ekholm P, *et al.* Assessment of soluble phosphorus load in surface runoff by soil analyses. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 1995, 56(1): 53-62
- Zhu T, Sikora FJ. Ammonium and nitrate removal in vegetated and unvegetated gravel bed microcosm wetlands. *Water Sci Technol*, 1995, 32(3): 219-228



## Removal Effect of Mariculture Wastewater and Analysis of Microbial Communities in Constructed Wetlands

WANG Jiapeng<sup>1,2</sup>, CUI Zhengguo<sup>2①</sup>, ZHOU Qiang<sup>1,2</sup>, MA Shaosai<sup>2</sup>, QU Keming<sup>2</sup>, MAO Chengquan<sup>3</sup>

(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** Constructed wetland, a new technique of wastewater treatment, has been widely used in fresh aquaculture wastewater treatment but not in mariculture wastewater treatment. In present study, we established a laboratory scale integrated vertical-flow constructed wetland (IVCW) to purify the mariculture wastewater. We examined the removal efficiencies of the main pollutants such as ammonia nitrogen, phosphate and chemical oxygen demand (COD), and explored the composition and structure of the bacteria community in IVCW using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The results suggest that the IVCW efficiently removed ammonia nitrogen, phosphate and COD ( $92.82\pm 3.27\%$ ,  $(72.53\pm 2.31)\%$  and  $(66.04\pm 8.23)\%$ , respectively). The results show a variety of bacterial divisions in the IVCW. The quantities of the dominant species were different in each layer of the IVCW. The Shannon-Wiener ( $H'$ ) of the down-flow tank is higher than that of the up-flow tank and it shows a decreasing trend along the water flow. The Dice coefficient (Cs) of microbial community in each layer showed an inverse relationship between the distance along the water flow and Dice coefficient. Six known bacteria groups including *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Nitrospirae* and *Firmicutes* were observed in the IVCW, and *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* were the dominant species. This study provide a theoretical reference for elucidating the removal mechanism of constructed wetlands.

**Key words** Constructed wetlands; Microorganism; Mariculture wastewater; Removal effect; PCR-DGGE

① Corresponding author: CUI Zhengguo, E-mail: cuizg@ysfri.ac.cn