



复合垂直流人工湿地基质细菌群落结构变化特征

夏国栋^{1,2}, 朱四喜^{1,2}, 赵伟^{1,2}, 王众³

(1. 贵州民族大学生态环境工程学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州民族大学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. 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] 采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术对复合垂直流人工湿地 5 个取样区基质中的细菌群落结构与多样性进行分析, 以探究基质细菌群落结构的变化特征与驱动因素。结果表明: 细菌群落丰度以及多样性随着复合垂直流人工湿地梯级处理呈现出先减后增的变化趋势, 二级垂直流上行池物种丰富度最高, 二级垂直流下行池物种丰富度最低; 湿地中优势菌种为变形菌门、厚壁菌门、绿弯菌门、放线菌门以及拟杆菌门, 此外, 绿弯菌门与酸杆菌门也占有一定的比例; 生境的变化使得变形菌门与拟杆菌门的群落丰度整体呈现出先增后减的变化趋势, 而厚壁菌门、绿弯菌门、放线菌门的群落丰度则与其变化趋势相反; γ -变形菌纲、 δ -变形菌纲、 α -变形菌纲在变形菌门中丰度最高, 厚壁菌门中梭状芽孢杆菌丰度最高, 而放线菌门中放线菌属丰度最高; 一级垂直流下行池至生物稳定塘的特征微生物各有不同; 冗余分析表明, 细菌菌群变化的主要驱动因子为 pH、溶解氧、氨态氮、硝态氮和总氮。

[关键词] 复合垂直流人工湿地; 细菌群落; 高通量测序; 冗余分析

[中图分类号] X53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-829X(2022)11-0113-09

Characterization of bacterial community variations in composite vertical flow constructed wetland substrates

XIA Guodong^{1,2}, ZHU Sixi^{1,2}, ZHAO Wei^{1,2}, WANG Zhong³

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

Abstract: Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology was used to analyze the bacterial community structure and diversity of substrates in five sampling points in a composite vertical flow constructed wetland, to investigate the characteristics and driving factors of the change of bacterial community structure in substrates. The results showed that the abundance and diversity of bacterial communities had a trend of decreasing and then increasing with the gradient treatment of the composite vertical flow constructed wetland. The species richness of the secondary vertical flow upstream pool was the highest, while the species richness of the secondary vertical flow downstream pool was the lowest. The dominant species in the constructed wetland were Proteobacteria, Firmicutes, Chloroeclobacter, Actinobacteria and Bacteroidetes. In addition, Chloroeclobacter and Acidobacteria also occupied a certain proportion. Habitat modification had led to an overall trend of increasing and then decreasing in the abundance of phylum Proteobacteria and Bacteroidetes, and the opposite trend appeared in that of Firmicutes, Chlorobacteria and Actinobacteria. The abundance of γ -Proteobacteria, δ -Proteobacteria and α -Proteobacteria had the highest abundance in Proteobacteria, and the abundance of *Clostridium* was the highest in Firmicutes, while the abundance of *Horizontal Actinobacteria* was the highest in Actinobacteria. The characteristic microorganisms were different from the primary vertical flow downstream pond to the biological stabilization pond. Redundancy analysis showed that the main driving factors of the change of bacterial community were pH, dissolved oxygen, ammonia nitrogen, nitrate nitrogen and total nitrogen.

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31560107); 贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2018]2807)

Key words: composite vertical flow constructed wetland; bacterial community; high-throughput sequencing; redundancy analysis

近年来,人工湿地因其成本低、处理效果和稳定性好而被用于生活污水的处理^[1]。人工湿地对水质的净化与植物和微生物之间的协同作用密切相关^[2-3],湿地微生物的代谢直接影响到有机物的降解与转化^[4-6]。由于土壤微生物独特的敏感性,可以通过微生物群落多样性来表现土壤活力^[7-8]。作为污染物与微生物的主要堆积场所,人工湿地质地对微生物有很强的吸附能力,会与其发生一系列物理化学反应,使得微生物群落特征发生改变,同时对碳、氮、磷等营养元素有一定的截留和过滤能力^[9-11]。

由于单一人工湿地对污水的处理能力有限,近年来学者们构建了复合流人工湿地,既提高了湿地污水处理的效率与稳定性,又增加了湿地水力负荷和抗冲击能力。目前对于单一人工湿地系统的细菌群落结构特征研究很多,但是对于复合垂直流人工湿地中细菌多样性变化以及驱动因子的研究却很少。基于此,本研究拟利用 Illumina Miseq PE300 平台进行基因测序,对复合流人工湿地细菌群落结构与多样性进行研究,并结合湿地基质理化因子分析,为复合垂直流人工湿地的高效脱氮及其维护管理提供理论依据。

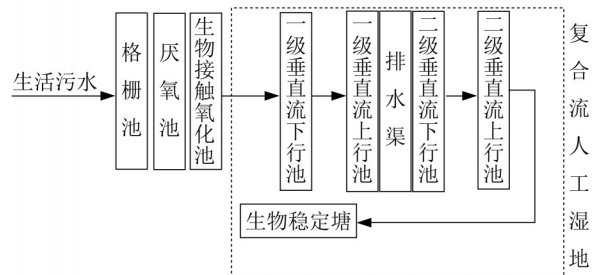
1 材料与方法

1.1 样品采集

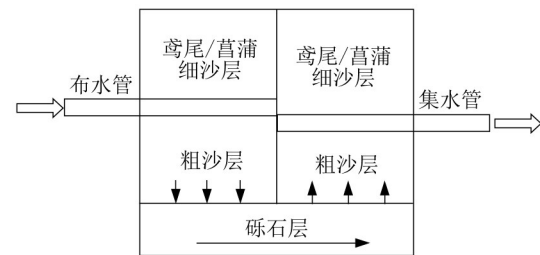
湿地基质样本取自贵州喀斯特地区瓮安县建中镇复合垂直流人工湿地中的各级人工湿地,人工湿地于2019年8月投入使用。喀斯特地区生境恢复力弱,存在水土流失、易被腐蚀等问题,同时受岩溶作用影响,湿地稳定性差且容易受到污染^[12]。

该地区对于生活污水的处理流程如图1(a)所示,污水流经预处理单元(格栅池、厌氧池、生物接触氧化池)后按顺序进入湿地系统各级处理单元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)、E(生物稳定塘)。该湿地系统占地240 m²,如图1(b)所示,每个池子自上而下分别填充细沙($d=0.2\sim0.4$ cm)层20 cm、粗砂($d=1\sim2$ cm)层20 cm、砾石($d=3\sim5$ cm)层40 cm,植物配置为鸢尾(*Iris tectorum Maxim*)+菖蒲(*Acorus calamus L.*)。在A、B、C、D、E共计5处设置采样点,采样温度为12℃,采样深度为距表层10 cm处,每个采样点采集3个平行样。用于测定细菌的样品放入便携式冰柜冷藏运输

至实验室后于-80℃保存以待后续实验。用于测定基质养分的样品放于自封袋,带回实验室后等待自然风干用于检测。



(a) 生活污水处理流程



(b) 湿地系统的填充及植物配置

图1 复合流人工湿地示意

Fig. 1 Schematic diagram of the composite flow constructed wetland

1.2 DNA 抽提和 PCR 扩增

根据 E. Z. N. A.[®] soil DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, US) 说明书进行微生物群落总DNA抽提,使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的提取质量,使用NanoDrop2000测定DNA浓度和纯度;使用338F和806R对16S rRNA基因V3~V4可变区进行PCR扩增。每个样品设置3个平行样。

1.3 Illumina Miseq 测序

将同一样本的PCR产物混合后,使用2%琼脂糖凝胶回收PCR产物,利用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行回收产物纯化和2%琼脂糖凝胶电泳检测,并用Quantus™ Fluorometer (Promega, USA) 对回收产物进行定量。使用NEXTflex™ Rapid DNA-Seq Kit (Bioo Scientific, 美国) 建库后,利用Illumina公司的Miseq PE300平台进行测序,原始数据上传至NCBI SRA数据库。

1.4 数据处理

使用Fastp^[13]软件对原始测序序列进行质控,使用

FLASH^[14]软件拼接后,利用UPARSE^[15]软件根据97%的相似度对序列进行OTU聚类并剔除嵌合体^[16-17]。利用RDP classifier^[18]对每条序列进行物种分类注释,比对Silva 16S rRNA数据库(version 138),设置比对阈值为70%。

采用Excel软件对原始数据进行初步整理;使用SPSS软件中单因素方差分析(One ANOVA)对土壤养分进行分析;利用Canoco5软件中的冗余分析(RDA)对理化因子与属水平细菌进行分析。采用Graphpad prism9.0软件作图,统计显著性水平 $p=0.05$,且表中数据表现形式为(均值 \pm 标准误差)。

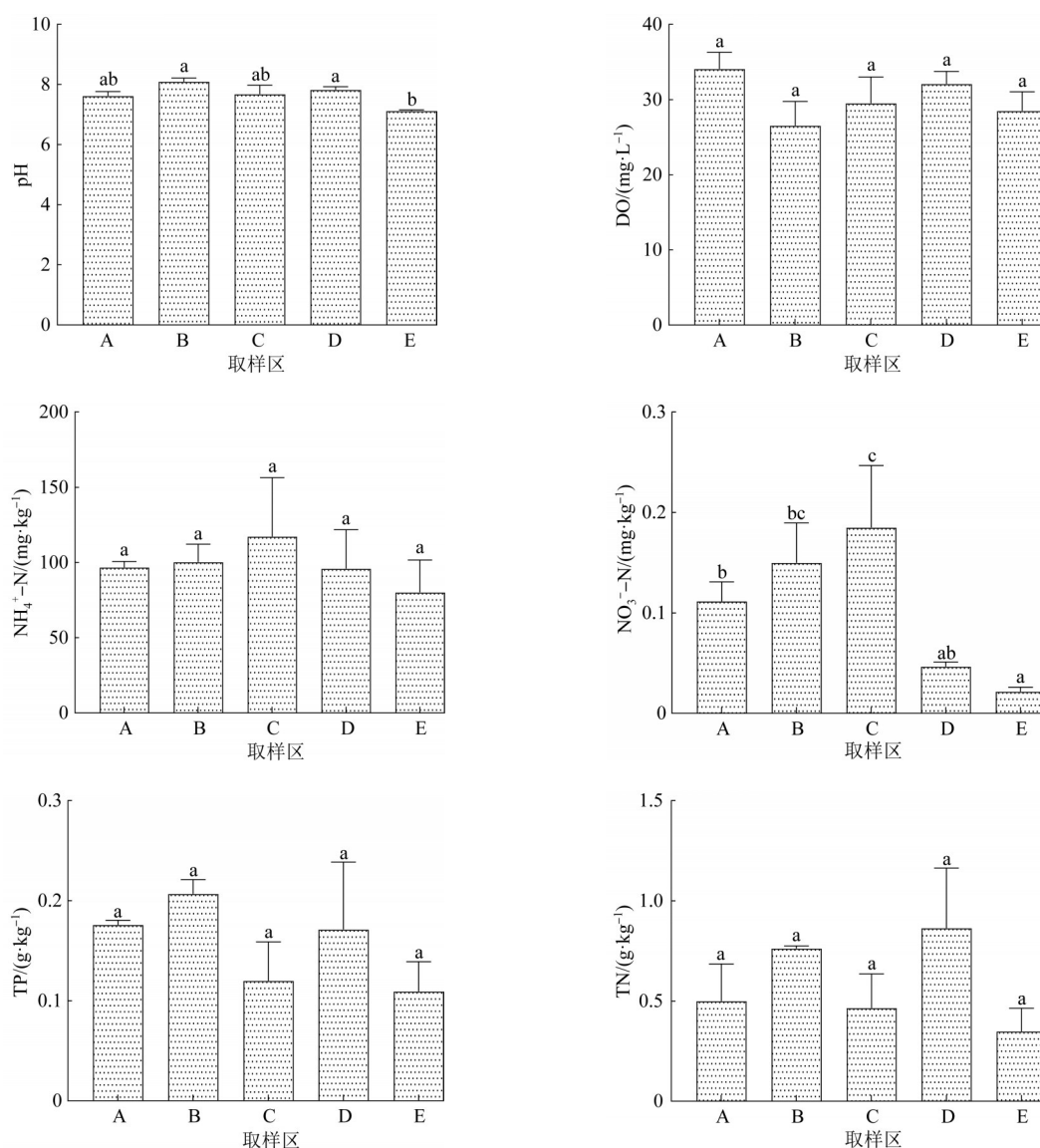
1.5 理化指标的测定

参照《土壤农业化学分析方法》测定湿地基质养分^[19];采用电位法测定pH;采用碘量法测定溶解氧(DO);采用硫酸消煮-水杨酸钠法测定总氮(TN);采用硫酸消煮-钼锑抗法测定总磷(TP);采用水杨酸钠法测定氨态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$);采用硫酸肼还原法测定硝态氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)。

2 结果与分析

2.1 复合流人工湿地基质理化性质分析

各级湿地土壤理化性质见图2。



图中每组数据由3组平行样测定值取平均得出,同列数据所标注的不同小写字母表示显著差异($p<0.05$)。

图2 各级湿地土壤理化性质

Fig. 2 Physical and chemical properties of wetland soil at all levels

由图2可知,复合垂直流人工湿地基质pH在7.126 7~8.093 3之间,偏中性和弱碱性,其中一级垂直流上行池基质pH最高,而生物稳定塘的酸碱度接近中性。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 在沿程各级湿地中的含量都有相同的变化规律,即先增高再降低,在二级垂直流下行池中达到峰值,其中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 在各级人工湿地基质中都有显著性差异。此外,基质中pH、DO、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、TP和TN在生物氧化塘中的含量均较一级垂直流下行池中有所减少,其中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、TP、TN分别减少17.16%、80.57%、37.90%、30.16%。

由图2还可以看出沿程各级人工湿地基质各理化性质的变化趋势。pH与DO的变化趋势均比较平稳,pH在生物氧化塘的值接近中性,DO最大值出现在一级垂直流下行池,最小值位于一级垂直流上行池。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的变化有相似的规律, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 峰值为117.21 mg/kg, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 峰值为0.18 mg/kg,峰值均在二级垂直流下行池中出现。TP与TN的最小值均分布在生物氧化塘,TP存在极大值,分布在一级垂直流上行池与二级垂直流上行池,TN在二级垂直流上行池达到最高值,次高值位于一级垂直流上行池。

2.2 复合流人工湿地细菌群落多样性指数分析

复合流人工湿地物种Alpha多样性指数分析见表1。

表1 复合流人工湿地物种Alpha分析

Table 1 Species Alpha analysis in compound artificial wetland

样品来源	Chao	Faith's Pd	OTU	Shannon	Simpson
一级垂直流下行池	854.200	72.159	854	8.694	0.994
一级垂直流上行池	789.512	69.982	789	8.298	0.989
二级垂直流下行池	695.333	62.266	695	7.849	0.976
二级垂直流上行池	867.119	76.167	867	9.126	0.997
生物稳定塘	861.161	68.017	861	8.733	0.995

由表1可知,各样品Chao指数在695~867之间,Shannon与Simpson指数分别在7.849~9.126与0.976~0.997之间。从Alpha多样性指数分析中可以看出,二级垂直流上行池中物种丰度最高,生物氧化塘次之,但是一级垂直流下行池的微生物丰度要高于一级垂直流上行池和二级垂直流下行池的数据,这可能是由于污水流动过程中将预处理工艺中的微生物带入一级垂直流下行池导致其丰度增加。在该人工湿地环境之中,微生物群落的丰度以及多样性随着人工湿地梯级处理先减小,在二级垂直流下行池达到最低,之后恢复到较高水平,其原因推测为污水经过预处理进入人工湿地系统,将微生物带入湿地系统导致初始丰度增加,之后逐级递减,达到二级垂直流下行池时最低,之后由于水

质得到提高,该湿地生态环境中的微生物群落更加丰富化。

图3是OTU韦恩图,从韦恩图可以看出各级人工湿地样本OTU的数目组成相似性和重叠情况。5个采样点中重叠的OTU数目为140,每个采样点的OTU数目也各有不同,其中二级垂直流上行池(867)>生物稳定塘(861)>一级垂直流下行池(854)>一级垂直流上行池(789)>二级垂直流下行池(695)。同时从表1也能看出二级垂直流上行池具有最大多样性与均匀性,Chao指数以及Shannon指数分别为867.119与9.126。而二级垂直流下行池物种异质性即多样性最简单,Faith's Pd指数与Simpson指数最小,分别为62.266与0.976。

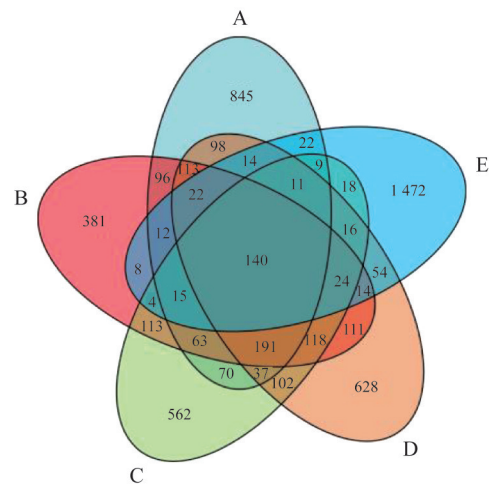


图3 OTU韦恩图

Fig. 3 OTU Wayne

2.3 复合流人工湿地微生物物种组成

图4为各级湿地微生物在门水平上的相对分布情况。

由图4可知,湿地整体环境中核心门类为变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、放线菌门(Actinobacteria)与拟杆菌门(Bacteroidetes),优势菌群占总菌群的比例高于80%。其中,变形菌门在核心门类中表现优异,各取样区内其比例均高于30%,并且随着湿地处理的梯级推进,变形菌门占比呈现先增大后减小的变化趋势,在一级垂直流上行池中表现最优,丰度高于60%。丰度同样呈现先增加再减少变化趋势的还有拟杆菌门。而厚壁菌门、绿弯菌门、放线菌门的丰度随着处理过程的推进均呈现出一个先减小再增大的变化趋势,厚壁菌门在一级垂直流上行池丰度只占不到10%,但是之后的递增可以看出厚壁菌门类细菌也是污水处理的优势菌种。在研究中发现,优势菌门在一级垂直流上行池、二级垂直流下行池

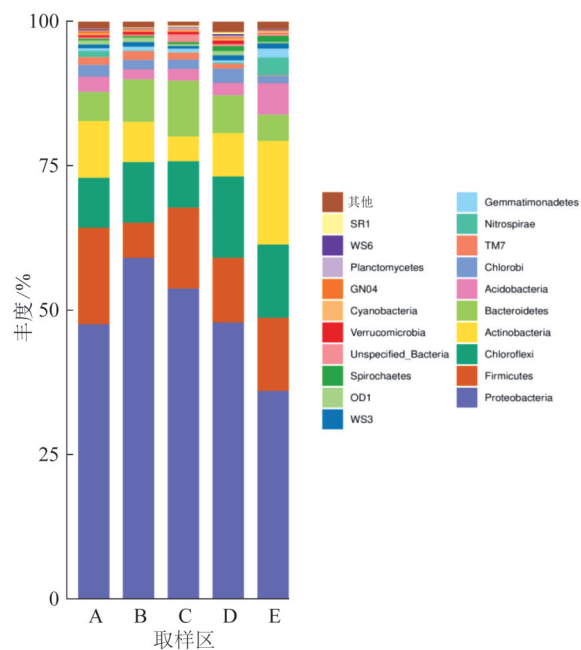


图4 各级湿地微生物在门水平上的相对分布
Fig. 4 Relative distribution of microorganisms in different levels of wetland at phylum level

中丰度最高,并且各优势门类丰度转折变化的拐点均在一级垂直流上行池与二级垂直流下行池中。

所取样品中的菌群在门水平上的热图见图5。

由图5可以直观看出各级湿地中3个平行样与

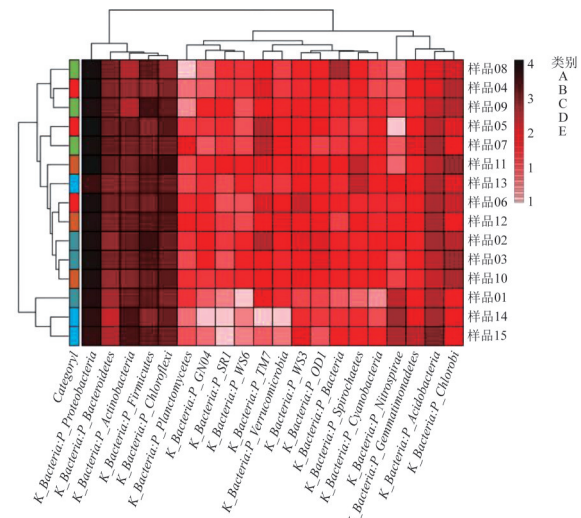


图5 门分类水平热图
Fig. 5 Heat map of phylum classification level

微生物丰度的相关程度,再次验证了变形菌门、厚壁菌门、绿弯菌门、放线菌门与拟杆菌门在总群落中的优势地位。另外需要注意的是,除了以上的优势菌群外,酸杆菌门(Acidobacteria)与绿菌门(Chlorobi)与样品间的相关性也比较显著,相关系数>2。

2.4 复合型人工湿地组间 OTU 差异显著分析

图6所示为LDA 差异贡献分析(LEfSe)的进化分支图(Cladogram)。

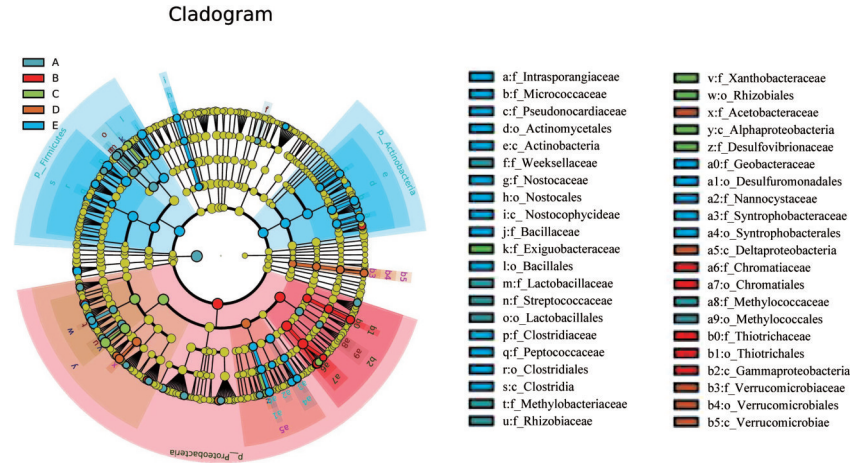


图6 进化分支图
Fig. 6 Cladogram

Cladogram由内到外辐射的圆圈分别对应界门纲目科属不同的分类层级,层级间的连线代表所属关系。每个圆圈节点代表一个物种,黄色节点代表分组间差异不显著,差异物种跟随组进行着色。有颜色的扇形区域标注了特征微生物的下属分类区间。由图6可知,在复合流人工湿地中变形菌门所包含的特征微生物范

围最广,其次是厚壁菌门以及放线菌门。变形菌门中的γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria)、δ-变形菌纲(Deltaproteobacteria)、α-变形菌纲(Alphaproteobacteria)丰度最高。进一步分析发现一级垂直流上行池中硫发菌目(Thiotrichales)、着色菌目(Chromatiales)与一级垂直流下行池中的甲基球菌目(Methylococcales)在γ-变

形菌纲中有显著性表现。生物稳定塘中 δ -变形菌纲中的除硫单胞菌目(Desulfuromonadales)与互营杆菌目(Syntrophobacterales)丰度最高。二级垂直流下行池中的根瘤菌目(Rhizobiales)在 α -变形菌纲中表现最优异。放线菌门在目水平上放线菌(Actinomycetales)丰度最高,且多集中在生物稳定塘中。厚壁菌门中梭状芽孢杆菌(*Clostridia*)丰度最高,乳杆菌(*Lactobacillus*)与芽孢杆菌(*Bacillus*)次之,梭状芽孢杆菌与芽孢杆菌多分布在生物稳定塘,而乳杆菌在一级垂直流下行池中分布较多。

图7为LEfSe分析LDA柱形图。

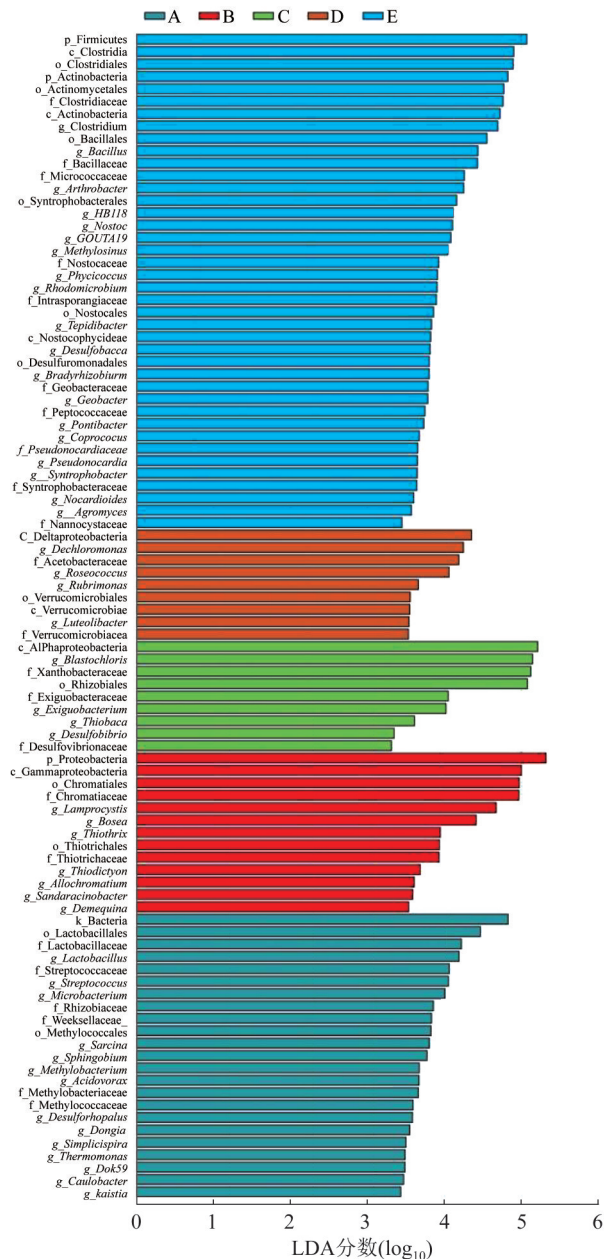


图7 LDA柱形图

Fig. 7 LDA histogram

LDA柱形图中每一横向柱形体代表一个物种。柱形体的长度对应LDA值, LDA值越高则差异越大。柱形体的颜色对应该物种组别。由图7可知,一级垂直流下行池中丰度最高的特征微生物是厚壁菌,之后是梭状芽孢杆菌。 δ -变形菌是一级垂直流上行池丰度最高的特征微生物,其次丰度较高的是脱氯单胞菌(*Dechloromonas*)。二级垂直流下行池的特征微生物有 α -变形菌、芽生绿菌(*Blastochloris*)、黄色杆菌(*Xanthobacteraceae*)和根瘤菌(*Rhizobiales*),其丰度大小排序为 α -变形菌>芽生绿菌>黄色杆菌>根瘤菌。二级垂直流上行池中 γ -变形菌丰度最高,值得注意的是,着色菌在二级垂直流上行池菌群中也占有很大的比例。生物稳定塘中的微生物以乳杆菌为主。此外,由图7还可以看出,微生物多样性从一级垂直流下行池至生物稳定塘的过程中呈现出先减小后增大的变化,这也与Alpha多样性分析相吻合。

2.5 复合流人工湿地菌属与环境因子的关系分析

对属水平的细菌与土壤理化性质之间的相关性进行冗余分析,结果见图8。

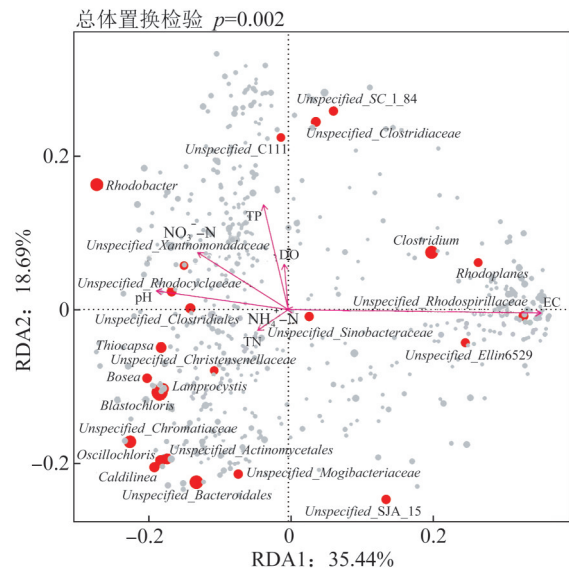


图8 属水平细菌与土壤理化性质关系的冗余分析

Fig. 8 Redundant analysis of the relationship between bacteria at genus and physical and chemical properties of soil

图8显示,第1、第2排序轴分别解释了总变异的35.44%和18.69%。pH是黄单胞菌属(*Xanthomonadaceae*)与红环菌属(*Rhodocyclaceae*)的环境驱动因子,而 NO_3^- -N、DO与黄单胞菌属、红杆菌属(*Rhodobacter*)以及根瘤菌属关系密切,呈现正相关的关系。此外,属于变形菌门的芽生绿菌属、硫杆菌属(*Thiocapsa*)、博斯

氏菌属(*Bosea*)、着色菌属(*Chromatiaceae*)以及放线菌属(*Actinomycetales*)都受到TN的调控,与TN正相关。值得一提的是,梭状杆菌属(*Clostridium*)受 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N、TN的影响,与之呈现出显著的负相关关系。

3 讨论与分析

在复合流人工湿地环境中,细菌群落分布、多样性随污水梯度处理呈现先减小后增大的变化趋势,这也与付家晖等^[20]对博斯腾湖水体与沉积环境微生物群落的研究结论类似。由于水体具有流动性,会把预处理过程中的微生物带入复合流人工湿地中,再加上沉积环境又给了微生物一个稳定生存的场所^[21],使得一级垂直流下行池微生物丰度和多样性暂时呈现最大化。污水中有机物转换、重金属吸附行为都与微生物群落分布及其多样性有重要的关系^[22],待污水进入人工湿地之后水质得到改善,细菌菌群多样性特征也随着水质的净化过程发生改变。

在复合流人工湿地环境中,优势菌种为变形菌门、厚壁菌门、绿弯菌门、放线菌门与拟杆菌门,且优势菌门相对丰度占到80%以上,其中,变形菌门相对丰度最高。I. VAZ-MOREIRA等^[23]也发现,不管是自然水体还是人工水体中,变形菌门相对丰度均较高,其在污水处理以及氮磷形态转换方面都起到了十分重要的作用^[24]。有研究表明,厚壁菌门大量存在于污水净化过程之中^[25],在本研究中也发现,厚壁菌门是复合流人工湿地处理污水过程中的优势菌种。此外,具有一定数量的绿菌门与酸杆菌门也是需要注意的菌种,绿菌门参与硫化物的分解以及碳循环过程^[26],目前对酸杆菌门的研究较少,但有研究表明酸杆菌的相对丰度与pH呈现显著负相关关系,并且其对纤维素有一定的降解作用^[27-28]。

在复合流人工湿地环境中,变形菌门中的 γ -变形菌纲、 δ -变形菌纲、 α -变形菌纲丰度最高,这些都是湿地常见的细菌菌群^[29], α -变形菌纲可以对湿地中氨氮进行去除, γ -变形菌纲、 δ -变形菌纲对湿地的硝酸盐和亚硝酸盐有去除作用。另外,在一级垂直流上行池发现了变形菌门中的着色菌目,这是一类能够进行光合作用的细菌。厚壁菌门中芽孢杆菌的相对丰度也很高,其对氮和有机物有去除作用,并且对环境有较强的适应能力,此外,还有一定的防病作用^[30-31]。

研究表明,土壤微生物群落多样性特征受土壤环境因子的调控^[32],不同细菌菌群也会受到一个或

多个环境因子的调控^[33]。通过RDA分析发现, NO_3^- -N与属于变形菌门的黄色杆菌属、红杆菌属以及根瘤菌属呈现出正相关的关系。而之后的研究发现,变形菌、黄色杆菌与根瘤菌在二级垂直流下行池中丰度最高,而 NO_3^- -N同样在二级垂直流下行池中含量最高,证明 NO_3^- -N是黄色杆菌属、红杆菌属以及根瘤菌属的主要驱动因素之一。RDA分析也证实了溶解氧与红杆菌属有着显著的正相关关系,这与梁伟光等^[34-35]的研究结果一致。TN与属于变形菌门的芽生绿菌属、硫杆菌属、博斯氏菌属、着色菌属以及放线菌门的放线菌属呈现正相关的关系,其在二级垂直流上行池中含量最高,其次较高的浓度出现在二级垂直流下行池中。值得一提的是,二级垂直流下行池中的特征细菌是变形菌以及芽生绿菌,而着色菌在二级垂直流上行池中也占有很大的比例。研究表明,TN是芽生绿菌属、硫杆菌属、博斯氏菌属、着色菌属的主要驱动因素。此外,通过RDA分析发现梭状杆菌属与pH、 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N、TN呈现出显著负相关的关系,梭状杆菌大量出现在生物氧化塘中,生物氧化塘内pH、 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N、TN均达到最小值,得出pH、 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N、TN是梭状杆菌的主要驱动因素。

综上所述,复合垂直流人工湿地基质中细菌菌群分布会根据生境的变化而改变,pH、DO与氮盐是细菌群落分布的主要驱动因素。与此同时,菌群变化特征也对人工湿地处理功效有相应的调控作用,在串联式人工湿地的梯级处理过程中,本研究所识别并讨论的优势细菌在对碳、氮、磷元素的去除中都有所表现,尤其是在每一级湿地中,优势菌群对于氮元素形态的转化都有很大的贡献,由此不难推测,复合垂直流人工湿地对氮元素的去除有一定的优化作用。遗憾的是,一些优势细菌在脱氮过程中的调控作用仍然未知,有待更深入的研究。

4 结论

本研究在复合垂直流人工湿地中,对各级湿地基质的细菌群落特征变化进行了简要分析,得到以下几点结论:

(1)在该复合流人工湿地中,通过对细菌群落多样性的分析发现,物种丰度最高的单元为二级垂直流上行池,二级垂直流下行池微生物多样性最少,其OTU数目排序为二级垂直流上行池(867)>生物稳

定塘(861)>一级垂直流下行池(854)>一级垂直流上行池(789)>二级垂直流下行池(695)。从污水处理工艺来看,微生物群落的丰度以及多样性随着人工湿地梯级处理呈现先减小后增大的变化趋势。

(2)在该复合流人工湿地中,通过对细菌群落多样性组成分析发现,复合流人工湿地中优势菌群总的相对丰度高于80%,优势菌群门类为变形菌门、厚壁菌门、绿弯菌门、放线菌门与拟杆菌门。除优势菌群以外,参与硫化物分解的绿菌门与多存在于重金属污染水体中的酸杆菌门也存在于各级人工湿地中。在该复合流人工湿地中,通过对细菌组间差异性分析可得,复合流人工湿地中变形菌门中的 γ -变形菌纲、 δ -变形菌纲、 α -变形菌纲丰度最高,放线菌门在属水平上放线菌属丰度最高,厚壁菌门中梭状芽孢杆菌丰度最高,乳杆菌与芽孢杆菌丰度次之。

(3)一级垂直流下行池中丰度最高的特征微生物是厚壁菌,一级垂直流上行池中丰度最高的特征微生物是 δ -变形菌,二级垂直流下行池特征微生物有 α -变形菌、芽绿菌、黄色杆菌以及根瘤菌,二级垂直流上行池中变形菌中的 γ -变形菌丰度最高,着色菌也占有一定比例,生物稳定塘中以梭状芽孢杆菌为主。

(4)复合流人工湿地中TN是芽生绿菌属、硫杆菌属、博斯氏菌属、着色菌属以及放线菌门的放线菌属的主要驱动因子。 pH 、 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N、TN是梭状杆菌属的主要驱动因子。属于变形菌门的黄色杆菌属、红杆菌属以及根瘤菌属受到 NO_3^- -N的调控,而好氧反硝化的红杆菌属受到溶解氧的调控。

参考文献

- [1] 祝志超, 缪恒锋, 崔健, 等. 组合人工湿地系统对污水处理厂二级出水的深度处理效果[J]. 环境科学研究, 2018, 31(12): 2028-2036. ZHU Zhichao, MIAO Hengfeng, CUI Jian, et al. Advanced treatment performance of combined constructed wetland system on secondary effluent from wastewater treatment plant[J]. Research of Environmental Sciences, 2018, 31(12): 2028-2036.
- [2] 常建军, 吴苏青, 梁康, 等. 复合垂直流人工湿地微生物特征对典型污水的响应差异[J]. 环境科学研究, 2016, 29(8): 1200-1206. CHANG Junjun, WU Suqing, LIANG Kang, et al. Responses of microbial features in integrated vertical-flow constructed wetlands (IVCWs) for treatment of two types of representative wastewater[J]. Research of Environmental Sciences, 2016, 29(8): 1200-1206.
- [3] 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. FAN Haiqing, WANG Lingwen, WANG Dan, et al. High-throughput sequencing analysis of the bacterial communities in constructed wetland[J]. Bulletin of Science and Technology, 2019, 35(2): 213-219.
- [4] LADD J N, AMATO M, VAN VEEN H A. Soil microbial biomass: Its assay and role in turnover of organic matter C and N[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36(9): 1369-1372.
- [5] 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. XIONG Jiaqing, LI Shanshan, GE Yuan, 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.
- [6] 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. ZHANG Xiang, YAN Maocang, XIAO Guoqiang, et al. Analysis of microbial community structure in mangrove constructed wetland-mariculture coupling system[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(3): 557-564.
- [7] KHAN S, HESHAM A E L, QIAO Min, et al. Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2010, 17(2): 288-296.
- [8] ZHANG Jian, QIN Jing, ZHAO Congcong, et al. Response of bacteria and fungi in soil microcosm under the presence of pesticide endosulfan[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2015, 226(4): 1-9.
- [9] DAVIDSON E A, JANSSENS I A. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change[J]. Nature, 2006, 440: 165-173.
- [10] KJELLIN J, HALLIN S, WÖRMAN A. Spatial variations in denitrification activity in wetland sediments explained by hydrology and denitrifying community structure[J]. Water Research, 2007, 41(20): 4710-4720.
- [11] 李丹蕾, 呼唤, 刘云根, 等. 模拟不同水位梯度对湖滨湿地底泥碳氮磷化学计量特征的影响[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2021, 50(5): 669-676. LI Danlei, HU Huan, LIU Yungen, et al. Effects of simulated different water table gradients on carbon, nitrogen and phosphorus stoichiometric characteristics of sediment in lakeside wetland[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition, 2021, 50(5): 669-676.
- [12] 陈静, 罗明明, 廖春来, 等. 中国岩溶湿地生态水文过程研究进展[J]. 地质科技情报, 2019, 38(6): 221-230. CHEN Jing, LUO Mingming, LIAO Chunlai, et al. Review of eco-hydrological process in Karst wetlands of China[J]. Geological Science and Technology Information, 2019, 38(6): 221-230.
- [13] CHEN Shifu, ZHOU Yanqing, CHEN Yaru, et al. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-i890.
- [14] MAGOČ T, SALZBERG S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [15] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [16] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the

- present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1994, 44(4): 846-849.
- [17] WANG Qiong, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [18] 张振龙. 胶和木聚糖对中华绒螯蟹和黄颡鱼生长、消化和肠道菌群的影响[D]. 苏州: 苏州大学, 2014.
- ZHANG Zhenlong. The effects of pectin and xylan on growth, digestion and intestinal flora in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [D]. Suzhou: Soochow University, 2014.
- [19] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- LU Rukun. Methods for Soil agrochemical Analysis [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000.
- [20] 付家晖, 薛娜娜, 潘响亮. 博斯腾湖人工湿地中微生物群落空间分布特征[J]. 干旱区研究, 2020, 37(2): 487-495.
- FU Jiahui, XUE Nana, PAN Xiangliang. Spatial distribution of microbial communities in the wetland sewage treatment system constructed on Bosten Lake [J]. Arid Zone Research, 2020, 37(2): 487-495.
- [21] 刘浩峰, 刘巍, 刘玉燕, 等. 博斯腾湖湿地 Cu、Ni 和 Pb 的分布特征及其生态风险[J]. 干旱区研究, 2017, 34(2): 390-394.
- LIU Haofeng, LIU Wei, LIU Yuyan, et al. Distribution of Cu, Ni and Pb and ecological risk in the Bosten Lake wetland [J]. Arid Zone Research, 2017, 34(2): 390-394.
- [22] THAUER R, SHIMA S. Biogeochemistry: Methane and microbes[J]. Nature, 2006, 440(7086): 878-9.
- [23] VAZ-MOREIRA I, NUNES O C, MANAIA C M. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: Searching the links with the human microbiome [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2014, 38(4): 761-778.
- [24] 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.
- [25] YE Lin, SHAO Mingfei, ZHANG Tong, et al. Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing[J]. Water Research, 2011, 45(15): 4390-4398.
- [26] CHEN Yi, WEN Yue, TANG Zhiru, 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.
- [27] 王光华, 刘俊杰, 于镇华, 等. 土壤酸杆菌门细菌生态学研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(2): 14-20.
- WANG Guanghua, LIU Junjie, YU Zhenhua, et al. Research progress of acidobacteria ecology in soils [J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(2): 14-20.
- [28] PANKRATOV T A, KIRSANOVA L A, KAPARULLINA E N, et al. *Telmatobacter bradus* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic facultative anaerobe from subdivision 1 of the *Acidobacteria*, and emended description of *Acidobacterium Capsulatum* kishimoto et al. 1991 [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt 2): 430-437.
- [29] 王皓, 钱琪卉, 丁瑞睿, 等. 复合潜流人工湿地对农村生活污水的净化效果及其微生物群落结构特征[J]. 安徽农业大学学报, 2020, 47(6): 962-970.
- WANG Hao, QIAN Qihui, DING Ruirui, et al. Performances of a hybrid horizontal subsurface-flow constructed wetland system treating on rural domestic sewage and its microbial community structure characteristics [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2020, 47(6): 962-970.
- [30] 宋兆齐, 王莉, 刘秀花, 等. 云南和西藏四处热泉中的厚壁菌门多样性[J]. 生物技术, 2015, 25(5): 481-486.
- SONG Zhaoqi, WANG Li, LIU Xiuhua, et al. Diversities of Firmicutes in four hot springs in Yunnan and Tibet [J]. Biotechnology, 2015, 25(5): 481-486.
- [31] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103.
- CHEN Zhongyi, ZHANG Jie, HUANG Dafang. Research progress on antimicrobial mechanism and genetic engineering of *Bacillus* for plant diseases biocontrol [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(2): 97-103.
- [32] 李敏, 闫伟. 海拔对乌拉山油松根围真菌群落结构的影响[J]. 菌物学报, 2019, 38(11): 1992-2006.
- LI Min, YAN Wei. Effects of altitude on rhizosphere fungal community structure of *Pinus tabulaeformis* in Wula Mountain, China [J]. Mycosystema, 2019, 38(11): 1992-2006.
- [33] 赵玉卉, 路等学, 金辉, 等. 甘肃省野生羊肚菌根际细菌群落与土壤环境因子相关性研究[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 514-528.
- ZHAO Yuhui, LU Dengxue, JIN Hui, et al. Relationship between the bacterial community and environmental factors in the rhizosphere soil of wild morels in Gansu [J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 514-528.
- [34] 梁伟光, 黄廷林, 张海涵, 等. 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, 2022, 43(1): 306-313.
- LIANG Weiguang, HUANG Tinglin, ZHANG Haihan, et al. Characteristic analysis of *nirS* denitrifying bacterial community in Lijiahe Reservoir during stratification [J]. Environmental Science, 2022, 43(1): 306-313.
- [35] 钊珍芳. 典型水体中 *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, 2019.
- ZHAO Zhenfang. Community structure and denitrification characteristics of *nirS*-type denitrifiers in typical water bodies [D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2019.
- [作者简介] 夏国栋(1998—), 硕士研究生。E-mail: 944089396@qq.com。通讯作者: 朱四喜, 博士, 教授。E-mail: zhusixi2011@163.com。
- [收稿日期] 2022-08-15(修改稿)