

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2024.09.016

苦草及茎叶附着微生物净化水质的昼夜变化

赵青, 孙永利, 黄鹏, 田腾飞, 张玮嘉, 李鹤男, 张岳
(中国市政工程华北设计研究总院有限公司, 天津 300074)

摘要: 沉水植物的茎叶附着了大量微生物,其光合作用的主要场所在茎叶,目前在沉水植物光合作用和呼吸作用下,茎叶附着微生物对水体脱氮除磷效果的昼夜变化规律尚不明确。选用典型沉水植物苦草,培养一段时间后清洗部分茎叶附着物,与未经清洗的苦草进行对比,观察24 h内两组苦草所在水体DO、ORP等指标的变化情况,以N、P浓度变化表征茎叶微生物发生的脱氮除磷反应,并结合显微镜、高通量测序技术进行综合分析。结果表明,茎叶附着微生物量少的苦草所在水体的DO昼夜差值达9.1 mg/L,其他指标波动较小;茎叶附着微生物量多的苦草所在水体的DO和ORP分别在0~3.7 mg/L和0~150 mV之间昼夜波动。日间水体 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 下降、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 升高、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 和TP下降,发生硝化、好氧反硝化、除磷反应;夜间N、P指标的变化与日间相反,发生反硝化和释磷反应。苦草茎叶附着好氧、兼氧及厌氧多种类型的微生物,优势菌门为 *Proteobacteria* 等,优势菌属为 *norank_f_Rhizobiales_Incertae_Sedis* 等,丰度排名前20的优势菌属中与脱氮除磷相关的功能菌属共14种,其中反硝化菌属10种,为主要功能菌属,占比为36.43%,包括 *Hyphomicrobium*、*Rhodobacter*、*unclassified_f_Rhizobiaceae* 3种好氧反硝化菌。在沉水植物与茎叶附着微生物的共同作用下,水体净化昼夜变化机理类似于间歇曝气、周期为24 h、附着生长的SBR工艺运行原理。

关键词: 沉水植物; 茎叶附着微生物; 脱氮除磷; 昼夜变化

中图分类号: TU992 **文章编号:** 1000-4602(2024)09-0098-09

Diurnal Variation of *Vallisneria* and Microorganisms Attached to the Stems and Leaves for Water Purification

ZHAO Qing, SUN Yong-li, HUANG Peng, TIAN Teng-fei, ZHANG Wei-jia,
LI He-nan, ZHANG Yue

(North China Municipal Engineering Design & Research Institute Co. Ltd., Tianjin 300074,
China)

Abstract: A large number of microorganisms are attached to the stems and leaves of submerged plants, and their main photosynthetic sites are in the stems and leaves. At present, the diurnal variation of nitrogen and phosphorus removal performance of stem and leaf attached microorganisms under photosynthesis and respiration of submerged plants is still unclear. In this paper, part of the stems and leaves of a typical submerged plant *Vallisneria* were cleaned after culture for a period of time to make a comparison with the uncleaned stems and leaves. The changes of DO, ORP and other indicators of the water bodies with two kinds of *Vallisneria* were observed within 24 h. The nitrogen and phosphorus

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2017ZX07403001)

通信作者: 孙永利 E-mail: tjsunyongli@163.com

removal reactions of the microorganisms attached to stems and leaves were characterized by changes in N and P concentrations, and combined with microscopy and high-throughput sequencing technology for comprehensive analysis. The diurnal difference of DO in the water with less stem and leaf attached microorganisms was 9.1 mg/L, and the other indexes fluctuated little. The DO and ORP of the water with abundant stems and leaves attached microorganisms fluctuated in the range of 0–3.7 mg/L and 0–150 mV, respectively. During the daytime, the $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in water decreased, the $\text{NO}_3^-\text{-N}$ in water increased, and $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ and TP in water decreased, indicating that nitrification, aerobic denitrification and phosphorus removal reactions occurred. The changes of N and P indexes at night were opposite to those during the daytime, and denitrification and phosphorus release reactions occurred. There were many types of aerobic, facultative and anaerobic microorganisms attached to the stems and leaves of *Vallisneria*. The dominant bacterial phylum was *Proteobacteria*, and the dominant bacterial genus was *norank_f_Rhizobiales_Incertae_Sedis*. Among the top 20 dominant bacterial genera in terms of abundance, there were 14 functional bacteria related to nitrogen and phosphorus removal, of which 10 were denitrifying bacteria with relative abundance of 36.43%, including 3 aerobic denitrifying bacteria *Hyphomicrobium*, *Rhodobacter* and unclassified_f_Rhizobiaceae. The mechanism of diurnal change of water purification under the joint action of submerged plants and stem and leaf attached microorganisms was similar to the operation principle of attached growth SBR process with intermittent aeration and cyclic time of 24 h.

Key words: submerged plants; microorganism attached to the stems and leaves; nitrogen and phosphorus removal; diurnal variation

水生植物在水体生态恢复、水质长效保持方面具有独特优势,其除自身吸收氮、磷等营养物外,还对大量微生物产生互作影响,在水体修复过程中发挥巨大作用。其中,沉水植物与水的关系最为密切,相比于只有部分植株与水体接触的挺水植物、浮叶植物、漂浮植物,沉水植物的植株整体没于水面之下。沉水植物叶片繁茂、舒展,根系退化甚至消失,其茎叶往往附着大量的微生物,如藻类、细菌、真菌等,仅附着细菌的数量就可达 $10^5\sim 10^7$ CFU/cm²[1]。沉水植物的茎叶附着微生物在水体系统中具有重要生态功能[2-4],如促进水体中碳、氮、磷等营养物循环,以及改善水体水质等。

已有研究表明[5-6],附着微生物与沉水植物茎叶直接接触后,沉水植物的生长阶段、生长季节等因素影响附着微生物菌群的丰度和组成,其光合作用和呼吸作用对茎叶附着微生物的影响更直接。沉水植物在水下进行光合作用,部分沉水植物主要通过叶片释氧[7-8],为水体创造富氧环境;沉水植物进行呼吸作用时吸收水体中的氧气,可使水体呈缺氧态。因此,在沉水植物光合作用和呼吸作用下,茎叶附着微生物中好氧型硝化菌、厌氧型反硝化菌等

生命活动可能存在昼夜差异,继而水体的脱氮除磷效果也存在昼夜波动。目前,关于沉水植物及茎叶附着微生物净化水质的昼夜变化研究较少。

笔者对沉水植物苦草(*Vallisneria*)及其茎叶附着微生物开展了时间序列研究,通过连续监测24 h内水体DO、ORP、氮、磷浓度的变化,观察在沉水植物与茎叶附着微生物作用下水体环境的变化特征,并结合显微镜及细菌16S rRNA高通量测序技术,分析茎叶附着微生物群落结构的特征,在沉水植物光合作用和呼吸作用下揭示茎叶附着微生物对水体脱氮除磷效果的昼夜变化规律。本研究对于进一步认识和利用沉水植物和茎叶附着微生物互作关系具有十分重要的意义,可为沉水植物的水体生态修复工程提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验植物

实验植物采用我国水体较为常见的沉水植物之一——苦草(*Vallisneria*),苦草植株购于网络,收货后转移至种植箱,自然光照下培养一段时间。

1.2 实验设计

实验过程中设置对照组(CK1、CK2)及实验组

(EP1、EP2)。苦草在种植箱预培养一段时间,使植株体表均附着微生物。在实验前清洗对照组中所用苦草植株茎叶表面的附着物,即实验组与对照组的差异之处在于茎叶附着的微生物量。

预培养阶段:种植箱为聚乙烯PE材质且顶部开口的白色水箱,底部铺满约10 cm的天津某河道底泥。为加快微生物在沉水植物上的附着速率,预培养用水采用富含有机质、泥沙、菌胶团、藻类、微生物等的天津某河道水,并调配 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、 $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$ 浓度分别约为10、5、0.5 mg/L,保证微生物及植物生长所需营养。将该种植箱置于自然光照下连续培养至少1个月,直至植株茎叶表面出现细密、肉眼可观、触感光滑的附着物。成株期苦草株高为 (40 ± 2) cm,鲜质量为 (3.95 ± 0.28) g。

实验阶段:选取生长良好、无病虫害的成株期苦草作为实验植株。实验组所用苦草直接从种植箱中移植,对照组所用苦草经“软毛刷擦拭+无菌水冲洗”清洗植株茎叶表面附着物后移入实验装置。待实验组和对照组内苦草长势良好后开始实验。

1.3 实验装置

实验装置如图1所示,其由配水桶、蠕动泵、反应器组成。配水桶容积为120 L,采用白色PE材质制成;反应器采用长、宽、高分别为40、20、50 cm的超白玻璃黏合而成;配水桶与反应器外均包裹遮光布,避免反应器水温过高及藻类生长。调节蠕动泵转速,设置反应器HRT为48 h,实验装置以连续流方式运行,配水经蠕动泵输送至反应器进水口,充分反应后经出水口流出。为尽可能贴合实际工程,装置底部铺设5 cm天津某河道的底泥,底泥体积约为4 L,各实验装置中种植50棵苦草。

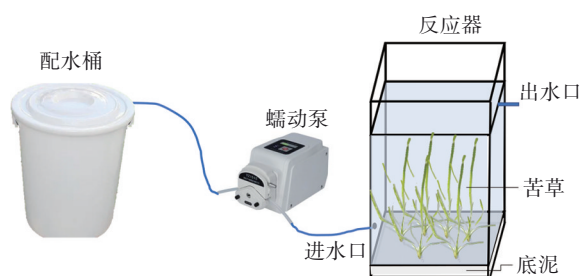


图1 实验装置示意

Fig.1 Schematic diagram of experimental device

进水由人工配制而成, NH_4^+-N (NH_4Cl)浓度约为10 mg/L, NO_3^--N (KNO_3)浓度约为5 mg/L、 $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$ (KH_2PO_4)浓度约为0.5 mg/L。监测前排空反应器

原水,注入配水,并开启蠕动泵稳定运行一段时间后进行监测。

1.4 实验监测

为研究在沉水植物(苦草)光合作用和呼吸作用下苦草与茎叶附着微生物协同作用对水体脱氮除磷的效果,需连续监测24 h,通过水体环境中污染物的变化来反映苦草与茎叶附着微生物对水体净化效果的昼夜变化。为保证实验结果显著,选择6月—8月中光照良好的晴天进行实验。受水生植物光合作用和呼吸作用的影响,水体DO和ORP也存在较大范围的波动,而硝化菌、反硝化菌等功能细菌的生命活动与水体氧化还原状态息息相关,故将DO、ORP纳入监测指标,采用便携式多参数水质检测仪测定相关指标,探头放置于反应器中部,每隔0.5 h记录一次数据。每隔1 h采集出水口处的水样,观察24 h内出水 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、 $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$ 、TP的变化情况。采用纳氏试剂分光光度法测定 NH_4^+-N ,采用盐酸-紫外分光光度法测定 NO_3^--N ,采用钼酸铵分光光度法测定 $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$,采用过硫酸钾消解—钼锑抗分光光度法测定TP。

1.5 茎叶附着微生物群落特征分析

用小刀、镊子分离实验组面积约为 1 cm^2 的苦草叶片表皮,置于研究级显微镜下观察。为研究苦草茎叶附着微生物的群落特征,提取实验组苦草叶片的微生物。随机截取苦草叶片10 g,浸没于0.1 mol/L无菌PBS溶液中,以180 r/min洗涤20 min,取出苦草叶片重复洗涤1次,再次取出叶片浸没于无菌PBS溶液中,超声洗涤10 min。汇总3次洗涤液,以12 000g离心10 min,收集沉淀用于16S rRNA高通量测序。测序流程如下:①DNA提取。完成基因组DNA提取,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性,利用NanoDrop2000检测DNA浓度和纯度。②PCR扩增。采用细菌特异性引物338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和808R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')在TransGen AP221-02(Trans Start Fastpfu DNA Polymerase, 20 μL)反应体系中进行PCR扩增,2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物为合格。③构建Illumina测序文库。采用TruSeq™ DNA Sample Prep KitIllumina文库构建试剂盒。④生物信息分析。对于Illumina测序得到的PE reads,首先根据overlap关系进行拼接,同时对序列质量进行质控和过滤,优化数据后进行沉水植物茎叶附着

微生物群落结构分析。

2 结果与分析

实验在自然光下进行,日出、日落时间分别为05:30和19:30。实验期间,反应器水温在24~28℃之间波动,适宜苦草生长。

2.1 对DO和ORP的影响

水体DO和ORP的变化曲线同笔者之前的研究结果^[7]类似,在沉水植物作用下昼夜波动明显,如图2所示。由图2(a)可知,与对照组相比,实验组水体DO波动幅度较小,对照组水体DO变化曲线峰值和谷值分别约为11.1和2.0 mg/L,实验组水体DO的峰值和谷值分别约为3.7和0.1 mg/L,均低于对照组。这是由于实验组沉水植物茎叶上的附着物远多于对照组,茎叶上的附着物对植物光合作用产生了负影响,阻抑了叶片和水体的气体交流。这也说明了叶片是沉水植物泌氧的主要部位之一,有助于硝化菌等好氧微生物生长增殖。从图2(b)可知,对照组水体ORP值在90~150 mV之间缓慢上升,实验组ORP值则呈现显著的昼夜波动,日间12:00—19:00维持在150 mV左右,之后在03:00时降至最低点,约为0 mV。由此可以看出,当沉水植物茎叶上存在大量附着微生物时,在光照条件下,水体DO基本维持在2~4 mg/L,ORP维持在120~150 mV,水体呈好氧化态,可为硝化、聚磷等反应提供适宜的环境;在无光照条件下,实验组DO最低降至约0.1 mg/L,ORP最低降至约0 mV,水体环境为缺(厌)氧还原态,促进茎叶上附着微生物进行反硝化反应。

对比实验组水体DO和ORP的变化情况发现,实验组水体DO变化较为平缓,ORP值的波动性更为剧烈。16:00左右光照减弱,水体DO浓度开始下降,而此刻水体ORP值仍处于高值(约150 mV),至19:30出现缓慢下降;次日05:30光照增强,此刻水体DO浓度即开始增加,而水体ORP值在06:30才出现上升。这一现象说明,ORP的变化较DO存在滞后性,DO是化合态氧,其变化不会直接导致ORP的变化,但可通过影响植物茎叶上附着物质的氧化还原反应来引发水体ORP的变化。且较低浓度的DO升降会引起ORP较大幅度的变化,如21:00—02:00时,水体DO从2.2 mg/L降至0.1 mg/L,同阶段水体ORP由138.5 mV降至6.2 mV,次日05:30—

09:00,水体DO增幅仅为0.7 mg/L,而ORP增加近155.0 mV。

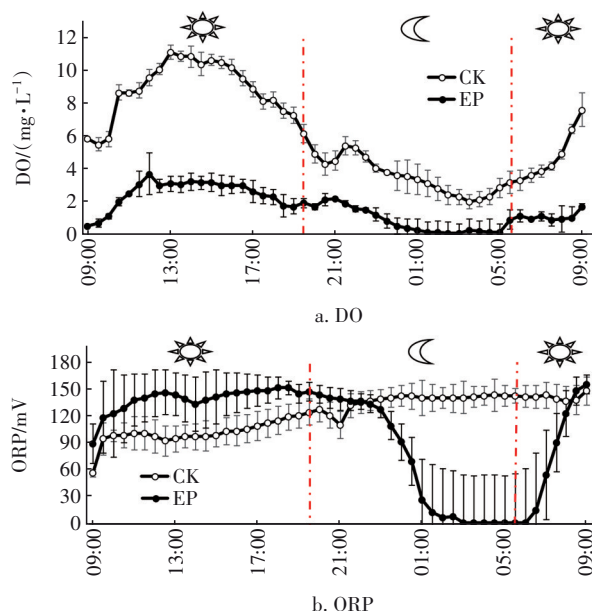


图2 对照组与实验组水体中DO和ORP的变化

Fig.2 Change of DO and ORP in water bodies in the control and experimental group

2.2 对氮去除的影响

以水体中 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 的变化表征硝化反应和反硝化反应,对照组与实验组出水 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 的变化如图3所示。进水 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、TN浓度分别约为10.22、6.03、18.10 mg/L。从图3(a)可以看出,对照组与实验组出水 NH_4^+-N 浓度均低于进水,对照组出水 NH_4^+-N 浓度基本维持稳定,各时间点 NH_4^+-N 浓度均值约为6.62 mg/L,实验组出水 NH_4^+-N 浓度在2.70~5.39 mg/L之间波动,均低于对照组,说明茎叶附着微生物可强化沉水植物去除 NH_4^+-N 效果。同时可以观察到,实验组出水 NH_4^+-N 浓度在09:00—18:00光照条件下由5.17 mg/L降至2.70 mg/L,18:00后光照减弱,逐步上升至5.39 mg/L,说明茎叶附着微生物去除 NH_4^+-N 受沉水植物光合作用和呼吸作用的影响而存在昼夜变化。由图3(b)可以看出,在24 h内,对照组出水 NO_3^--N 浓度波动较小,基本维持在5.70 mg/L,实验组出水 NO_3^--N 浓度在09:00—19:00光照条件下由7.35 mg/L增加至9.35 mg/L,19:00日落后其浓度逐渐降低,说明水体中 NO_3^--N 浓度同样受到沉水植物光合作用和呼吸作用的影响。

分析发现,日间光照时,实验组出水 NH_4^+-N 浓

度下降、 NO_3^- -N浓度上升,说明白天茎叶附着微生物发生了硝化反应。对照组出水 NO_3^- -N浓度约为5.70 mg/L,低于进水 NO_3^- -N浓度,实验组出水 NO_3^- -N浓度均高于进水值,最高可达9.35 mg/L,为进水值的1.55倍,说明实验组系统中硝化反应显著。在18:00—次日08:00弱光照甚至无光照条件下,实验组出水 NH_4^+ -N上升,最大涨幅为2.69 mg/L, NO_3^- -N浓度下降,最大降幅为2.12 mg/L,低于 NH_4^+ -N的最大涨幅,说明本实验中反硝化反应不显著,可能是预培养时间不足导致反硝化菌未形成优势菌种,也可能是受到碳源不足的制约,这需要结合高通量测试结果验证。

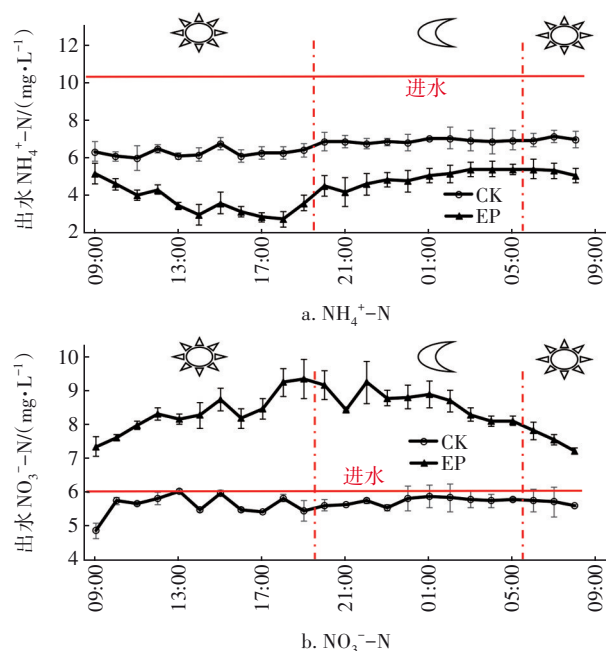


图3 对照组与实验组出水 NH_4^+ -N和 NO_3^- -N的变化

Fig.3 Change of NH_4^+ -N and NO_3^- -N in effluent from the control and experimental group

2.3 对磷去除的影响

对照组与实验组出水 PO_4^{3-} -P和TP的变化如图4所示。从图4(a)可以看出,对照组出水 PO_4^{3-} -P浓度变化较小,约为0.32 mg/L;实验组出水 PO_4^{3-} -P存在明显的昼夜变化,在09:00—16:00出现明显降低,最低可达0.22 mg/L,比对照组出水 PO_4^{3-} -P低约0.1 mg/L,在17:00—21:00期间出现0.16 mg/L的骤增,21:00时后缓慢增长至0.42 mg/L,比对照组出水 PO_4^{3-} -P高约0.1 mg/L,茎叶附着微生物吸收的磷又被完全释放出来。说明在日间光照条件下,沉水植物光合作用促进了茎叶附着微生物对磷的吸

收,但在夜间沉水植物呼吸作用下对茎叶附着微生物释放磷同样具有促进作用。

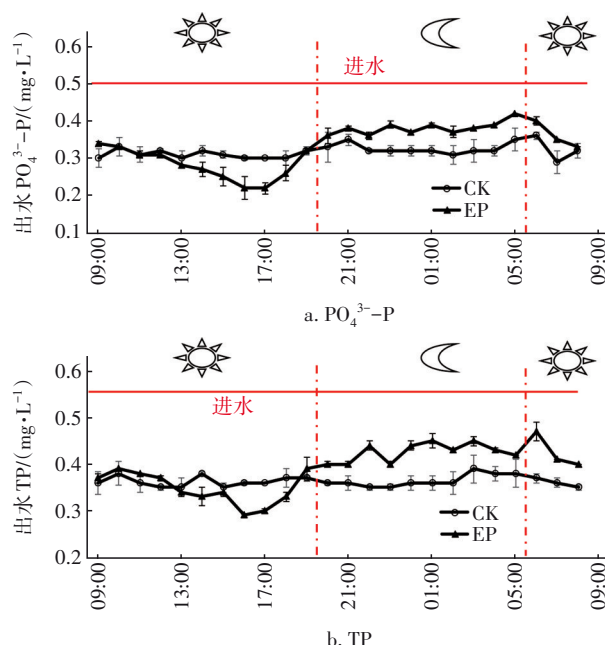


图4 对照组与实验组出水 PO_4^{3-} -P和TP的变化

Fig.4 Change of PO_4^{3-} -P and TP in effluent from the control and experimental group

2.4 茎叶附着微生物的特征

沉水植物叶片附着微生物的结构见图5。

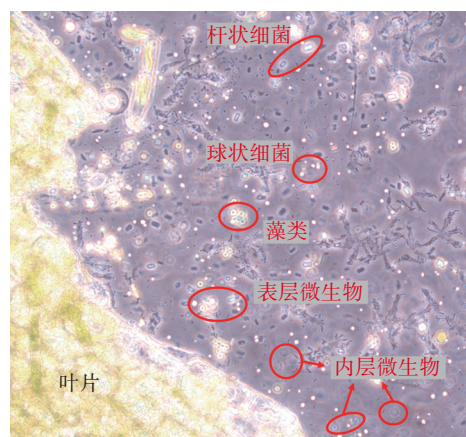


图5 叶片附着微生物镜检特征

Fig.5 Characterization of microorganism on leaf surface under microscopy

由图5可知,苦草叶片细胞排列整齐,细胞内叶绿素呈现亮绿色,说明苦草叶片中叶绿素含量丰富,苦草处于健康的生长状态。同时可以观察到苦草叶片表面附着一层物质,其结构致密,其中掺杂着含量丰富的多种微生物,如藻类、球状细菌、杆状

细菌等。有些附着微生物边界清晰,内部结构依稀可见,而部分微生物边界晕染,内部结构无法直接观察,说明附着物具有一定厚度,不同层次均有微生物生长。

门水平和属水平上的微生物群落结构见图 6。由图 6(a)可知,在门水平上,种群丰度排名前 10 的分别为: *Proteobacteria*(变形菌门)、*Acidobacteriota*(酸杆菌门)、*Cyanobacteria*(蓝细菌门)、*Gemmatimonadota*(芽单胞菌门)、*Actinobacteriota*(放线菌门)、*Bacteroidota*(拟杆菌门)、*Deinococcota*、*WPS-2*、*Verrucomicrobiota*(疣微菌门)、*Nitrospirota*(硝化螺旋菌门)。变形菌门为苦草叶片附着微生物群落的优势菌门,占比为 69.19%,包含多种代谢物质。硝化螺旋菌门丰度排名第 10,占比为 1.19%,属于典型硝化菌,可支撑氮向硝氮的转化。

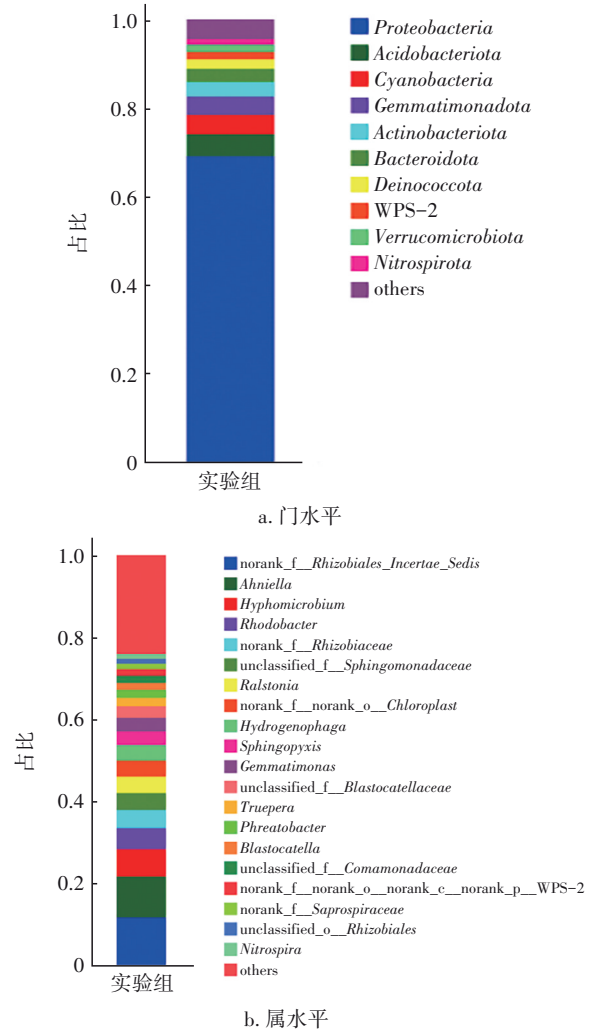


图 6 微生物群落结构柱状图
Fig.6 Histogram of microbial community structure

由图 6(b)可以看出,在属水平上 norank_f_Rhizobiales_Incertae_Sedis、Ahniella、Hyphomicrobium 等为种群丰度前 20 的优势菌属。70% 的优势菌属参与氮、磷的去除,共计 14 种,见表 1。可知,10 种细菌具有反硝化功能,硝化菌共 1 种为 Nitrospira; norank_f_Rhizobiales_Incertae_Sedis 为根瘤菌科未知属,具有固氮能力; norank_f_Saprospiraceae 属可促进含氮物质的降解;参与氮循环的功能菌属的丰度共计占 50.55%。与磷去除相关的优势菌属有 2 种, unclassified_f_Rhizobiaceae 属除反硝化功能外还具有聚磷作用,为除磷优势菌种,占比为 4.30%; unclassified_f_Blastocatellaceae 在成熟的除磷颗粒污泥中被观测到,占比为 2.77%。

表 1 与氮、磷去除相关的优势功能菌属

Tab.1 Dominant functional bacteria at genus level related to nitrogen and phosphorus removal

序号	菌属	功能	丰度/%	参考文献
1	norank_f_Rhizobiales_Incertae_Sedis	固氮	11.73	[9]和[10]
2	Hyphomicrobium	反硝化	6.74	[11]
3	Rhodobacter	反硝化	5.18	[12]
4	unclassified_f_Rhizobiaceae	反硝化 聚磷	4.30	[13]
5	unclassified_f_Sphingomonadaceae	反硝化	4.16	[12]
6	Ralstonia	反硝化	3.96	[14]
7	Hydrogenophaga	反硝化	3.69	[12]
8	Sphingopyxis	反硝化	3.39	[12]
9	unclassified_f_Blastocatellaceae	除磷	2.77	[15]
10	Truepera	反硝化	2.13	[16]
11	unclassified_f_Comamonadaceae	反硝化	1.68	[12]
12	unclassified_o_Rhizobiales	反硝化	1.20	[17]
13	norank_f_Saprospiraceae	氮降解	1.20	[18]
14	Nitrospirota	硝化	1.19	
合计			53.32	

3 讨论

在沉水植物和茎叶附着微生物的双重作用下,水体进行好氧化态-缺(厌)氧还原态昼夜交替变化。当茎叶附着的微生物较少时,苦草光合作用释放氧气,呼吸作用消耗氧气,水体 DO 浓度日间可达

5.5~11.1 mg/L,处于高水平,夜晚低至2.0~5.4 mg/L,处于低水平;在茎叶附着微生物的影响下,沉水植物与水体氧传递受阻,增加耗氧负荷,水体DO浓度整体水平偏低,夜间最低至0 mg/L。ORP曲线的变化点晚于DO曲线变化点的原因是由于水体DO变化直接影响了茎叶附着微生物进行氧化还原反应,进而间接影响水体ORP。

在沉水植物光合作用和呼吸作用影响下,茎叶附着微生物日间和夜晚发生不同的氮、磷反应。在光照条件下,植物光合作用释放氧气,水体 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度下降、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度升高,且 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度为进水浓度的1.55倍,茎叶附着硝化菌活跃,主要进行硝化反应,同时水体 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 、TP浓度下降,茎叶附着聚磷菌发生吸磷反应;在非光照条件下,植物呼吸作用消耗氧气,水体 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度上升、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度下降,茎叶附着反硝化菌进行反硝化反应,同步水体 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 、TP浓度上升,发生释磷反应。本实验虽未从 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度变化观测到显著的反硝化反应,但测序结果显示丰度排名前20的优势菌属中存在10种反硝化菌,且占比为36.43%。也有研究表明,沉水植物菹草可附着多种反硝化菌^[19]。表1的反硝化菌中 *Hyphomicrobium*、*Rhodobacter*、unclassified_f_Rhizobiaceae 为好氧反硝化菌,也可以在日间发生反应,这也是09:00—18:00时间段 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 涨幅(1.9 mg/L)低于 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 降幅(2.47 mg/L)的原因之一。沉水植物茎叶与茎叶附着微生物协同作用,如同根系对沉积物中微生物的影响一样,会强化硝化-反硝化脱氮等反应^[20]。

水环境DO和ORP的昼夜交替变化为好氧型、兼氧型及厌氧型微生物创造生存环境。从苦草叶片镜检结果来看,苦草茎叶表面附着物含有大量球状细菌、杆状细菌、藻类等微生物,且附着物具有一定的厚度。研究发现,沉水植物茎叶附着物存在特殊的茎叶微界面^[21],DO等空间分布差异较为明显^[22]。本实验苦草叶片上也检测到多种类型的微生物,如*Nitrospirota*为好氧型,*Truepera*、*Blastocatella*为厌氧型。

沉水植物与茎叶附着微生物所在的水体系统实际上可以看作间歇曝气、周期为24 h、附着生长的SBR工艺。沉水植物茎叶可作为微生物载体,在沉水植物体表形成生物膜,增加水体系统中微生物量。沉水植物还可作为“全自动曝气机”,通过自身

光合作用和呼吸作用使水体持续处于24 h为一个周期的好氧、缺氧、厌氧交替环境。对水体脱氮除磷的过程如下:日间,处于光合作用状态下的水生植物向水体中持续供氧,茎叶附着微生物在有氧条件下进行硝化、有氧反硝化、吸磷等反应, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 得到去除;夜晚,水生植物进入呼吸作用状态后,不仅不会向水体供氧,甚至可能与微生物竞争溶解氧,使水体快速进入缺氧状态,通过反硝化菌的新陈代谢实现 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和有机物的同步净化。但实际工程中也要考虑出现反硝化效果不显著及夜晚释磷现象。沉水植物与茎叶附着微生物对水体脱氮除磷效果的昼夜变化见图7。

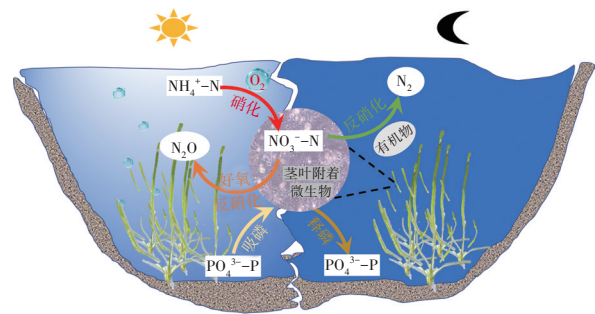


图7 沉水植物与茎叶微生物脱氮除磷过程的昼夜变化

Fig.7 Diurnal variation of nitrogen and phosphorus removal processes in submerged plants and microorganism attached to the stems and leaves

4 结论

① 苦草的光合作用和呼吸作用使水体形成富氧-厌氧昼夜交替出现的氧化-还原环境,茎叶附着微生物作用阻碍了沉水植物与水体的氧传递过程,增加了耗氧负荷,夜间水体DO可降至约0 mg/L,ORP亦可降至约0 mV。

② 在苦草和茎叶附着微生物的共同作用下,水体氮、磷昼夜变化明显。日间,水体 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度下降、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度升高,且 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度为进水浓度的1.55倍,发生显著的硝化反应,同时 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 涨幅(1.9 mg/L)低于 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 降幅(2.47 mg/L),发生好氧反硝化反应;夜间, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度上升、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度下降,发生反硝化反应,但 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 涨幅高于 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 降幅,反硝化反应不显著。水体 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 和TP的浓度日间下降、夜间增长,分别发生吸磷反应和释磷反应。

③ 苦草茎叶表面附着物结构致密,具有一定的厚度,微生物含量丰富,存在好氧、兼氧及厌氧等

多种类型的微生物。茎叶附着微生物优势菌门为 *Proteobacteria* 门,优势菌属为 *norank_f_Rhizobiales_Incertae_Sedis_Ahniella*、*Hyphomicrobium* 等。丰度排名前20的优势菌属中与脱氮除磷相关功能的菌属共14种,其中反硝化菌属10种,为主要功能菌属,占比为36.43%,硝化菌属1种,其他氮功能菌2种,除磷优势菌属2种。反硝化菌属中还检测到 *Hyphomicrobium*、*Rhodobacter*、*unclassified_f_Rhizobiaceae* 三种好氧反硝化菌。

④ 沉水植物的光合作用和呼吸作用使茎叶附着微生物处于昼夜交替的氧化-还原环境,微生物日间发生硝化、好氧反硝化、吸磷反应,夜晚发生反硝化、释磷反应,故沉水植物与茎叶附着微生物所在水体系统类似间歇曝气、周期为24 h、附着生长的SBR工艺。

参考文献:

- [1] 何聃,任丽娟,邢鹏,等. 沉水植物附着细菌群落结构及其多样性研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(2): 161-168.
HE Dan, REN Lijuan, XING Peng, *et al.* Research progress of diversity and community structure of epiphytic bacteria on submerged macrophytes [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2014, 26(2): 161-168(in Chinese).
- [2] QIU Z, ZHANG S H, DING Y, *et al.* Comparison of *Myriophyllum Spicatum* and artificial plants on nutrients removal and microbial community in constructed wetlands receiving WWTPs effluents [J]. Bioresource Technology, 2021, 321: 124469.
- [3] 邢书语,原璐彬,刘鑫,等. 沉水植物体表附着物重量及碳氮磷元素含量特征分析[J]. 环境化学, 2021, 40(7): 2092-2104.
XING Shuyu, YUAN Lubin, LIU Xin, *et al.* Characterization of dry weight and elements contents of biofilms attached on aquatic macrophytes and non-living substrates surface [J]. Environmental Chemistry, 2021, 40(7): 2092-2104(in Chinese).
- [4] 宋旭,林陶,夏品华,等. 沉水植物附植生物膜藻类组成及重金属累积特征[J]. 湖泊科学, 2019, 31(5): 1268-1278.
SONG Xu, LIN Tao, XIA Pinhua, *et al.* Algae composition and accumulation characteristics of heavy metals in epiphytic biofilms of submerged macrophytes [J]. Journal of Lake Sciences, 2019, 31(5): 1268-1278(in Chinese).
- [5] 严定波. 沉水植物附着生物膜细菌及反硝化菌群落多样性研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2020.
YAN Dingbo. Study on Bacterial and Denitrifying Community Diversity of Epiphytic Biofilms in Submerged Macrophytes [D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2020(in Chinese).
- [6] FAN Z, HAN R M, MA J, *et al.* Submerged macrophytes shape the abundance and diversity of bacterial denitrifiers in bacterioplankton and epiphyton in the shallow fresh Lake Taihu, China [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(14): 14102-14114.
- [7] 赵青,黄鹏,李鹤男,等. 基于DO和ORP考量水生植物的生态修复效果[J]. 中国给水排水, 2023, 39(5): 94-100.
ZHAO Qing, HUANG Peng, LI Henan, *et al.* Ecological restoration performance of aquatic plants based on DO and ORP consideration [J]. China Water & Wastewater, 2023, 39(5): 94-100(in Chinese).
- [8] 李华歆,殷春雨,杨国梁,等. 不同功能型沉水植物对溶解氧影响及环境效应[J]. 水生生物学报, 2024, 48(2): 232-241.
LI Huaxin, YIN Chunyu, YANG Guoliang, *et al.* Different functional types of submerged macrophytes on dissolved oxygen and its environmental effects [J]. Acta Hydrobiological Sinica, 2024, 48(2): 232-241 (in Chinese).
- [9] 胡宗福,常杰,佟庆,等. 高通量测序方法分析两种草食性淡水螺肠道菌群多样性[J]. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2622-2634.
HU Zongfu, CHANG Jie, TONG Qing, *et al.* High-throughput sequencing analysis of intestinal flora diversity of two freshwater snails (*Radix auricularia* and *Planorbella trivolvis*) [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(12): 2622-2634 (in Chinese).
- [10] JIA L P, CHEN X L, FANG L C, *et al.* Nitrogen removal in improved subsurface wastewater infiltration system: mechanism, microbial indicators and the limitation of phosphorus [J]. Journal of Environmental Management, 2023, 335: 117456.
- [11] CAO Q, LI X Z, XIE Z J, *et al.* Compartmentation of microbial communities in structure and function for methane oxidation coupled to nitrification-denitrification

- [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 341: 125761.
- [12] 张松贺, 王佳阳, 牟小颖, 等. 不同水体沉水植物叶面微生物群落特征[J]. *河海大学学报(自然科学版)*, 2022, 50(6): 66–74.
- ZHANG Songhe, WANG Jiayang, MU Xiaoying, *et al.* Characteristics of microbial community on leaf surface of submerged plants in different water bodies[J]. *Journal of Hohai University(Natural Sciences)*, 2022, 50(6): 66–74(in Chinese).
- [13] 余鸿婷, 李敏. 反硝化聚磷菌的脱氮除磷机制及其在废水处理中的应用[J]. *微生物学报*, 2015, 55(3): 264–272.
- YU Hongting, LI Min. Denitrifying and phosphorus accumulating mechanisms of denitrifying phosphorus accumulating organisms (DPAOs) for wastewater treatment: a review [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(3): 264–272(in Chinese).
- [14] 洪璇, 洪有为, 陈仲巍, 等. 九龙江河口区 *nirS* 型反硝化细菌多样性及系统发育学分析[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(9): 1639–1650.
- HONG Xuan, HONG Youwei, CHEN Zhongwei, *et al.* Phylogenetic diversity of *nirS*-type denitrifying bacteria in Jiulong River estuary[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(9): 1639–1650(in Chinese).
- [15] 陈希, 袁乙卜, 张建民, 等. 大分子有机物对除磷颗粒污泥特性及菌群结构的影响[J]. *环境科学学报*, 2021, 41(4): 1309–1322.
- CHEN Xi, YUAN Yibu, ZHANG Jianmin, *et al.* Effects of macromolecular organic matters on the characteristics and bacterial community structure of the phosphorus removal granular sludge [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2021, 41(4): 1309–1322(in Chinese).
- [16] 阮起炆. 发酵类废水硫自养反硝化耦合厌氧氨氧化处理研究[D]. 北京: 北京交通大学, 2020.
- RUAN Qiyang. Study on Treatment of Sulfur Autotrophic Denitrification Coupled with Anammox for Fermentation Wastewater [D]. Beijing: Beijing Jiaotong University, 2020(in Chinese).
- [17] 郭南飞, 韩智勇, 史瑞, 等. 农村垃圾厌氧-准好氧时空联合生物反应器中微生物群落分析[J]. *农业工程学报*, 2020, 36(19): 200–208.
- GUO Nanfei, HAN Zhiyong, SHI Rui, *et al.* Analysis of microbial community in the anaerobic/semi-aerobic spatiotemporal bioreactor for rural wastes [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2020, 36(19): 200–208(in Chinese).
- [18] 孙晓, 江捷, 王强, 等. 大型污水厂中填料对 A²O 系统微生物种群的影响[J]. *中国给水排水*, 2022, 38(7): 63–68.
- SUN Xiao, JIANG Jie, WANG Qiang, *et al.* Effect of suspended carrier on microbial community in A²O system in a full-scale wastewater treatment plant [J]. *China Water & Wastewater*, 2022, 38(7): 63–68 (in Chinese).
- [19] YAN L Y, ZHANG S H, LIN D, *et al.* Nitrogen loading affects microbes, nitrifiers and denitrifiers attached to submerged macrophyte in constructed wetlands [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 622/623: 121–126.
- [20] RACCHETTI E, LONGHI D, RIBAUDO C, *et al.* Nitrogen uptake and coupled nitrification–denitrification in riverine sediments with benthic microalgae and rooted macrophytes [J]. *Aquatic Sciences*, 2017, 79: 487–505.
- [21] 王文林, 刘波, 韩睿明, 等. 沉水植物茎叶微界面及其对水体氮循环影响研究进展[J]. *生态学报*, 2014, 34(22): 6409–6416.
- WANG Wenlin, LIU Bo, HAN Ruiming, *et al.* Research advancements and perspectives on leaf and stem micro-interfaces in submerged macrophytes and its effect on water nitrogen cycling [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(22): 6409–6416(in Chinese).
- [22] 董彬, 韩睿明, 王国祥. 沉水植物茎叶微界面特性研究进展[J]. *生态学报*, 2017, 37(6): 1769–1776.
- DONG Bin, HAN Ruiming, WANG Guoxiang, *et al.* Research advances in and perspectives on characteristics of the micro-boundary layer around leaves and stems of submerged macrophytes [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(6): 1769–1776(in Chinese).

作者简介: 赵青(1991–), 女, 河北石家庄人, 硕士, 工程师, 主要研究方向为黑臭水体整治、水生态修复等相关技术研发及政策标准编制。

E-mail: zhaoqing505@163.com

收稿日期: 2023–07–26

修回日期: 2023–12–05

(编辑: 任莹莹)