

人工湿地基质中酶活性和细菌生理群的时空动态特征

周巧红^{1,2}, 吴振斌^{1*}, 付贵萍¹, 成水平¹, 贺锋^{1,2}

(1. 中国科学院水生生物研究所 淡水生态和生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:对复合垂直流人工湿地基质中 6 种酶活性和 5 种细菌生理类群数量进行了测定. 结果表明各种酶活性在不同月份存在显著差异 ($p < 0.05$): 纤维素酶、蛋白酶和磷酸酶在 6 月、9 月和 12 月时都表现出较高的酶活性, 并且都显著地高于 3 月的酶活性; β -葡萄糖苷酶在 6 月时酶活性显著地高于其它月; 而脲酶活性在 9 月和 12 月时极显著地高于 3 月和 6 月 ($p < 0.01$); 脱氢酶活性在 6 月和 12 月时明显高于 3 月和 9 月. 相比较而言, 6 种酶活性的空间特征较为一致, 下行流池酶活性显著高于上行流池活性 ($p < 0.05$), 并且随着基质层深度的增加, 酶活性亦相对递减. 细菌生理类群数量在 6 月和 9 月达到高峰, 并且所反映出来的空间规律与酶活性有一致性.

关键词:人工湿地; 酶活; 生理类群; 时空动态

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)02-0108-05

Temporal and Spatial Characteristics of Substrate Enzyme Activities and Bacteria Physiological Groups in Constructed Wetland

ZHOU Qiao hong^{1,2}, WU Zhen bin¹, FU Gui ping¹, CHENG Shui ping¹, HE Feng^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Six enzymes and five bacteria physiological groups from the substrate (soil) of integrated vertical flowing constructed wetland are chosen to study temporal and spatial characteristics. The research results show that significant differences existed in each enzyme during different months ($p < 0.05$). The enzyme activities of cellulase, protease and phosphatase were significantly higher in June, September and December than those in March; The enzyme activity of β -glucosidase in June was significantly higher than those in other months; While urease activities in both September and December were extremely significantly higher than those in March and in June ($p < 0.01$); But the dehydrogenase was different from the above-mentioned enzymes, which had higher enzyme activities in June and in December than in March and in September. Compared with the temporal characteristics, the spatial characteristics of all six enzymes show consistency: the enzyme activities in the down-flow chamber were significantly higher than those in the up-flow chamber ($p < 0.05$), and all of the enzyme activities in both chambers were relatively lower with the increasing depths of substrate layers. The numbers of bacteria physiological groups were at peak in June and September and their spatial characteristics were the same with enzyme activities.

Key words: constructed wetland; enzyme activity; physiological groups of bacteria; temporal and spatial characteristics

近年来在处理生活污水以及工农业废水方面, 人工湿地生态系统以其低成本、高效率并且易管理的特点而得到广泛的应用^[1]. 在该系统处理污水过程中, 高分子量的有机污染物被降解成低分子量的营养物, 目前研究认为这些过程是由微生物代谢以及土壤酶所完成的^[2]. 湿地的基质(土壤)是系统中重要的营养聚集场所, 而粘附在基质颗粒上的微生物, 它们的种群组成以及数量直接影响着系统的净化容量和效果. 关于湿地微生物的研究以前主要集中在对病原菌、肠道细菌的鉴定以及去除方面, 而对土壤中细菌的种群以及酶活性的时空动态变化却鲜有报道^[1]. 本文对复合垂直流构建湿地中试系统基质中 6 种酶以及 5 种细菌生理类群的时空动态特征进行探讨, 有助于阐明人工湿地的净化机理, 丰富生

理、生化等方面信息.

1 材料与方法

1.1 系统构造及运行条件

系统是由底部相通的 2 个大小为 $9\text{ m} \times 9\text{ m}$ 的池子串联而成, 填料为砂和砾石, 2 池分别栽种美人蕉(*Canna generalis*)和石菖蒲(*Acorus tartaricoides*), 本系统具体结构参见文献^[3]. 系统进水为武汉东湖水果湖段的富营养化水体, 水力负荷平均为

收稿日期: 2004-06-19; 修订日期: 2004-09-13

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-102); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA601021); 国家杰出青年基金项目(39925007)

作者简介: 周巧红(1977~), 女, 博士研究生, 从事环境微生物学研究.

* 通讯作者.

$0.6\text{ m}^3\cdot(\text{m}^2\cdot\text{d})^{-1}$,系统从 2001 年 4 月开始运行,至今运行稳定,净化效果可参见文献^[4].

1.2 实验材料

基质样品采自中国科学院水生生物研究所复合垂直流人工湿地中试系统中,用柱状采样器采集不同位点基质,各位点基质采用梅花点阵法,混匀后拿回实验室分析.

1.3 水质指标的测定

人工湿地系统进水的物理指标如溶解氧(DO)、温度(t)、氧化还原电位(ORP)、pH 值等用 Cole Parmer 60648 型笔式测定仪进行测定,其它指标如生物需氧量(BOD)、化学需氧量(COD)、总氮(TN)、总磷(TP)、无机磷(IP)等的测定参照文献^[5].

1.4 基质酶活性的测定

磷酸酶采用 p -硝基苯磷酸钠法;蛋白酶采用 Folin Ciocalteu 比色法; β -葡萄糖苷酶采用硝基酚比色法;纤维素酶采用蒽酮比色法;脲酶采用奈氏比色法;脱氢酶采用 TTC 比色法.各种酶酶活单位表示如下:磷酸酶和 β -葡萄糖苷酶活性单位以每 g 土样每 h 产生的对硝基苯酚量表示;蛋白酶以每 g 土样 24h 产生酪氨酸量表示;纤维素酶以每 g 土样 72h 产生的葡萄糖量表示;脲酶以每 g 土样每 h 产生的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 量来表示;脱氢酶以每 g 土样 12h 转化的 H^+ 来表示.具体操作步骤参见文献^[6].

1.5 土壤有机质和全氮的测定

土壤有机质的测定采用重铬酸钾容量法——外

加热法,土壤全氮的测定采用改进的半微量凯氏法^[7].

1.6 细菌生理类群的测定

氨化细菌、硝化细菌、反硝化细菌、纤维素分解菌和嫌气性纤维素分解菌等均采用最大可能数法(MPN).氨化细菌的测定用蛋白胨琼脂培养基,硝化细菌的测定用改良的 Stephenson 培养基,反硝化细菌采用反硝化细菌培养基,纤维素分解菌和嫌气性纤维素分解菌分别采用依姆歇涅茨基培养基^[5,8].土壤前处理如下:称取 10 g 土样加入具有 100 mL 无菌水的三角瓶中,并将其放在振荡机上振荡 10 min,待土壤分散后,吸取 1 mL 土壤悬液进行系列稀释,具体参见文献^[6,8].

1.7 数据处理

基质测试项目重复 3 次,取平均值并求出标准偏差,用 Statistic 6.0 进行单因子方差分析.

2 结果与讨论

2.1 基质酶的时间动态

本研究选择了广泛存在于土壤中的磷酸酶、蛋白酶、 β -葡萄糖苷酶、纤维素酶、脲酶和脱氢酶进行测定,因为这些酶对土壤中 C、N 和 P 等主要营养物质以及有机质的转化起着重要作用.分别于 2003 年 3 月、6 月、9 月和 12 月中旬测定湿地系统下行流池距地面 0~5 cm 基质的酶活性,从表 1 可知各种基质酶活性表现不同的规律.

表 1 人工湿地不同月份基质酶活性

Table 1 Substrate enzyme activities of different months in the constructed wetland

酶种类	3 月	6 月	9 月	12 月
磷酸酶/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	378.19(14.14) ¹⁾	989.31(42.42)	1000.12(46.63)	1052.49(41.82)
蛋白酶/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	1.24(0.14)	1.04(0.27)	1.05(0.02)	1.35(0.02)
β -葡萄糖苷酶/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	34.37(1.41)	104.23(5.66)	21.29(2.41)	16.46(1.61)
纤维素酶/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	20.55(4.07)	52.31(13.84)	40.00(8.23)	38.27(8.88)
脲酶/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	117.11(19.61)	51.39(6.67)	212.78(29.42)	526.29(38.27)
脱氢酶/ $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$	66.22(8.49)	570.22(56.57)	12.31(4.26)	361.22(42.43)

1) 括号内为标准偏差,余同.

2.1.1 纤维素酶、蛋白酶、磷酸酶

纤维素酶、蛋白酶、磷酸酶分别涉及土壤的速效成分 C、N、P,纤维素酶能水解纤维素为纤维二糖分子;蛋白酶能酶解蛋白质及初步分解产物肽,最终生成氨基酸;磷酸酶的活性与有机磷的转化有关,它能酶促磷酸脂水解而释放出磷酸根^[6].它们在 6 月、9

月和 12 月都表现出较高的酶活性,并且都显著的高于 3 月的酶活性($p < 0.05$),3 个月之间不存在显著差异($p > 0.05$).分析其主要原因可能是人工湿地系统的运行保证了营养物的供应(表 2),并且水生植物美人蕉和石菖蒲的根系在 6 到 12 月一直维持较强的生命活动,消耗了 C、N、P 等速效成分,促使

这几种酶一直发挥作用.而刚刚经过寒冬的3月,生命活动相对减缓,所以酶活性显著降低.

表 2 人工湿地系统进水水质

Table 2 Influent quality of the constructed wetland

时间/月	pH	电导率(Cond) / $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	t/℃	DO / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	ORP /mV	COD / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	BOD / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	TN / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	TP / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	IP / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
6	7.39	812	29	1.43	236.56	50.95	10.9	3.76	0.533	0.331
12	9.23	312	15	6.31	671.9	45.83	8.3	3.75	0.224	0.107

2.1.2 β-葡萄糖苷酶

β-葡萄糖苷酶是一种参与土壤有机物降解的胞外酶,能裂解二聚糖和多聚糖以及β-葡萄糖苷键,在它的作用下,葡萄糖苷裂解为葡萄糖.4个月酶活性之间的比较发现6月酶活性显著的高于其它月($p<0.05$),3月次之,9月和12月酶活性最低,二者之间不存在显著差异($p>0.05$).Miller等的研究也表明,β-葡萄糖苷酶活性随着时间的变化而变化^[9].推测主要的原因是在本湿地系统中,6月时环境温度最高,并且系统中生命活动最旺盛,将消耗大量的葡萄糖来为生命活动提供能源,β-葡萄糖苷酶作为微生物所需主要能源的供应者^[10],将源源不断的为系统补充葡萄糖,而在3月,它需要为即将开始的生命活动作能量储备.

2.1.3 脲酶

脲酶活性在9月和12月显著的高于3月和6月($p<0.01$).这种趋势是与其反应方式有关的.脲酶以尿素为作用底物,酶促尿素的水解并生成氨和二氧化碳,而尿素是以植物残体的形式和以氮肥的形式进入土壤^[8].由于季节的更替和生命规律的循环,在系统中从9月到12月美人蕉和石菖蒲枯败的叶子逐渐进入系统中,为系统提供了大量的尿素来源,此时脲酶活性随之增强.

2.1.4 脱氢酶

脱氢酶是与上述酶类不同的一种与土壤有机质转化有关的酶,它能酶促碳水化合物、有机酸等有机质的脱氢反应,起着氢的中间传递体的作用^[11].它在3月和9月时差异不明显,6月和12月明显高于前面2个时间段($p<0.05$).在Rogers的研究中也同样发现了脱氢酶活性的季节差异显著性^[12].因为有机质是土壤速效N、P的源泉,在生命活动旺盛的6月,它需要不断地转化有机质为系统提供生命元素,而在12月,由于系统中枯落物的大量加入,导致腐殖质的增加,脱氢酶又提高了其酶活性,加快腐殖质的转化.

由上述结果可知各种酶活性在不同的月份存在着显著的差异,这些与Ebersberger和Ross等的研

究结论一致^[13,14].土壤酶对土壤这种微环境(温度、植物根系的分泌物、土壤水化学、pH)变化非常敏感^[2].由于土壤条件的不同以及系统不同的运行方式,导致酶活性的时间规律有所不同,所以可以通过外部调节营养物收支以及温度、湿度等多方面物理因素来提高系统的效率,达到理想的净化效果.

2.2 基质酶的空间分布

分别对湿地系统上行流池和下行流池基质6个层面的上述6种酶活性进行测试,6个层面依次距表层0~5cm、10~15cm、20~25cm、30~35cm、40~45cm、50~55cm,结果如图1所示.

可以得知除少数位点外,对所测的6种酶而言,下行流池酶活性显著高于上行流池活性,并且随着基质层深度的增加,酶活性亦相对递减.此结论与Tam的研究结果相符^[1].在本系统中,系统结构以及运行的特殊性是导致上行流池和下行流池酶活性差别的主要原因.因为下行流池高出上行流池10cm,致使2池中水位、氧含量等都有所不同,而且系统营养丰富的原水先经过下行流池,使得两池土壤理化性质表现出不一样的特性,这些可以从土壤有机质和全氮含量得到部分的印证(表3).表层酶活性高的结论与成水平^[15]、谢德体^[16]等人的研究结论相符,因为湿地系统植物根系主要分布在距地面0~25cm的空间内,使得此区间形成一个根际区,具有独特的物理、化学和生物学特性,其中的 O_2 浓度、Eh、微生物、根系分泌物以及pH值等都与非根际区表现出不同的规律,有其独特的根际效应^[17],这些因素直接或间接的影响着土壤酶活性.

2.3 细菌生理类群的时空规律

对湿地系统下行流池0~5cm和20~25cm的基质进行无菌收集并测定细菌数量.从表4中可以看出,6月和9月各细菌生理类群数量高于3月和12月.这主要是土壤温度、含水量、有机质、水解氮和速效钾等综合生态因子的影响所致^[18].细菌生理类群数量所反映出来的空间规律与酶活性有一致性,主要由于细菌等是土壤酶的重要来源^[19].值得注意的是,包括反硝化细菌和嫌气性纤维素分解菌

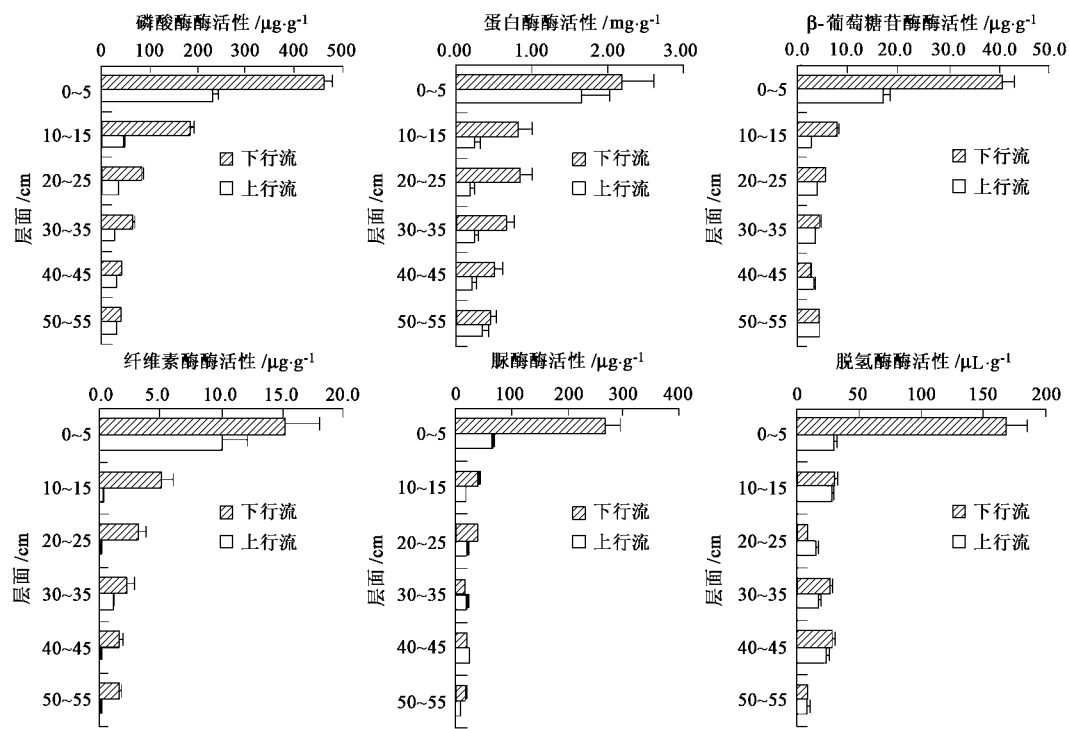


图 1 人工湿地不同位点基质酶活性

Fig.1 Substrate enzyme activities of different sites in the constructed wetland

表 3 人工湿地不同位点土壤有机质和全氮含量

项目	Table 3 Soil organic matter and total nitrogen of different sites in the constructed wetland					
	0 ~ 5cm		20 ~ 25cm		50 ~ 55cm	
	1 号	2 号	1 号	2 号	1 号	2 号
有机质/ %	11.43(0.62) ¹⁾	9.59(0.05)	2.28(0.30)	0.72(0.21)	1.22(0.48)	1.08(0.70)
全氮/ g·kg ⁻¹	5.0(0.32)	3.1(0.12)	4.0(0.30)	3.0(0.11)	3.0(0.15)	2.0(0.11)

表 4 人工湿地不同月份细菌生理类群的数量

细菌类群/ MPN·g ⁻¹	Table 4 Physiological groups numbers of bacteria of different months in the constructed wetland							
	3 月		6 月		9 月		12 月	
	上层	下层	上层	下层	上层	下层	上层	下层
氨化细菌 × 10 ⁶	5.5	1.6	2000	200	1600	200	450	11
硝化细菌 × 10	100	4	150	90	30	30	30	10
反硝化细菌 × 10 ⁵	3.5	16	110	3.5	14	3	3	0.4
纤维素分解菌 × 10 ³	0.85	0.35	110	25	110	9.5	110	1.5
嫌气性纤维素分解菌 × 10 ³	1.7	14	110	25	140	9.5	30	3.5

在内的兼性厌氧菌,在 0 ~ 5cm 层面和 20 ~ 25cm 的层面上表现出和好氧细菌氨化细菌、硝化细菌以及纤维素分解菌一样的规律,即是 0 ~ 5cm 层面的细菌数量要高于 20 ~ 25cm 的数量。兼性厌氧菌并没有随着深度的加深而数量增多,这主要是因为所测的下层深度在 20 ~ 25cm 之间,属于根际区,氧含量与表层土壤相比并没有明显的差别。

3 结论

在复合垂直流人工湿地这个生态系统中,由于各种基质酶参与不同的生化反应,再加上系统特殊的环境特征(土壤物理化学、营养物输入输出等等),导致酶活性表现出其特有的时空特征。以 3、6、9、12 月等 4 个月份为代表的时间段内,6 种涉及土壤有

机物转化的酶在不同的时间段内达到酶活性的高峰.相比于酶活性在时间上变化的不一致性,6种酶活性在空间上表现出较一致的规律,即是下行流池酶活性显著高于上行流池活性,并且随着基质层深度的增加,酶活性亦相对减少.对5种细菌生理类群数量的测定可以看出6月和9月数量要高于3月和12月.

致谢:感谢邓家齐、詹发萃、刘保元等老师对论文设计以及写作所给予的指导,感谢王亚芬、侯燕松等同学在实验过程中所给予的帮助.

参考文献:

[1] Tam N F Y. Effects of wastewater discharge on microbial populations and enzyme activities in mangrove soils[J]. Environmental pollution, 1998, **102**:233 ~ 242.

[2] Shackle V J, Freeman C, Reynolds B. Carbon supply and the regulation of enzyme activity in constructed wetlands[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, **32**:1935 ~ 1940.

[3] 吴振斌,周巧红,贺锋,等.构建湿地中试系统基质剖面微生物活性的研究[J]. 中国环境科学,2003, **23**(4):422 ~ 426.

[4] 吴振斌,詹德昊,张晟,等.复合垂直流构建湿地的设计方法及净化效果[J]. 武汉大学学报(工学版),2003, **36**(1):12 ~ 16.

[5] 国家环境保护局《水和废水监测分析方法》编委会.水和废水监测分析方法[M]. 北京:中国环境科学出版社,1989.

[6] 许光辉,郑洪元.土壤微生物分析方法手册[M]. 北京:农业出版社,1986.251 ~ 291.

[7] 南京农业大学.土壤农化分析[M]. 北京:农业出版社,1996.43 ~ 70.

[8] 中国科学院南京土壤研究所微生物室.土壤微生物研究法

[M]. 北京:科学出版社,1985.40 ~ 59.

[9] Miller M, Dick R P. Thermal stability and activities of soil enzymes as influenced by crop rotations[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1995, **27**(9):1161 ~ 1166.

[10] Turner B L, Hopkins D W, Haygarth P M, *et al.* β -glucosidase activity in pasture soils[J]. Applied soil ecology, 2002, **20**:157 ~ 162.

[11] 郭明,陈红军,王春蕾.四种农药对土壤脱氢酶活性的影响[J].环境化学,2000, **19**(6):523 ~ 527.

[12] Rogers B F, Tate III R L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in pineland soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, **33**:1389 ~ 1401.

[13] Ebersberger D, Niklaus P A, Kandeler E. Long term CO₂ enrichment stimulates N mineralisation and enzyme activities in calcareous grassland[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, **35**(7):965 ~ 972.

[14] Ross D J, Speir T W, Ketiles H A, *et al.* Soil microbial biomass, C and N mineralization and enzyme activities in a hill pasture: Influence of season and slow-release P and S fertilizer [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1995, **27**(11):1431 ~ 1443.

[15] 成水平,夏宜琚.香蒲、灯芯草人工湿地的研究 II ——净化污水的空间[J]. 湖泊科学,1998, **10**(1):62 ~ 66.

[16] 谢德体,陈绍兰,魏朝富,等.水田不同耕作方式下土壤酶活性及生化特性的研究[J].土壤通报,1994, **25**(5):196 ~ 198.

[17] 陈能场,童庆宣.根际环境在环境科学中的地位[J]. 生物学杂志,1994, **13**(3):45 ~ 52.

[18] 张崇邦,施时迪.退化草原碱蓬土壤微生物生物量的季节动态模型[J]. 应用与环境生物学报,2001, **7**(6):588 ~ 592.

[19] 张咏梅,周国逸,吴宁.土壤酶学的研究进展[J]. 热带亚热带植物学报,2004, **12**(1):83 ~ 90.