

DOI: 10.5846/stxb201809292125

孙红英, 辛全伟, 林兴生, 罗海凌, 林辉, 严少娟, 刘文莉, 兰思仁. 人工湿地植物种类及多样性对甲烷释放及功能基因丰度的影响. 生态学报, 2019, 39(22): - .

Sun H Y, Xin Q W, Lin X S, Luo H L, Lin H, Yan S J, Liu W L, Lan S R. Effects of plant species and diversity on methane emissions and functional gene abundances in constructed wetlands. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(22): - .

人工湿地植物种类及多样性对甲烷释放及功能基因丰度的影响

孙红英^{1,2,3}, 辛全伟¹, 林兴生¹, 罗海凌¹, 林辉¹, 严少娟^{1,4}, 刘文莉⁵, 兰思仁^{2,3,*}

1 福建农林大学国家菌草工程技术研究中心, 福州 350002

2 福建农林大学林学博士后科研流动站, 福州 350002

3 福建农林大学林学院, 福州 350002

4 福建农林大学资源与环境学院, 福州 350002

5 台州学院建筑工程学院, 台州 318000

摘要:为了研究人工湿地处理中碳/氮水平的废水时植物种类及多样性对系统甲烷释放及功能基因丰度的影响,我们构建了实验尺度的人工湿地微宇宙实验系统。选取千屈菜(*Lythrum salicaria* L.)和海寿花(*Pontederia cordata* L.)2种人工湿地常用、景观效果好的植物,在系统中配置了单种处理和两物种混种处理。结果表明:千屈菜与海寿花混种系统的甲烷释放强度($8.78 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)高于两物种单种系统的平均值($6.97 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) ($P < 0.001$),同甲烷释放一样,混种系统的 *mcrA* 基因绝对丰度($977541.6 \text{ copies/g dw soil}$)也高于两物种单种系统的平均值($585146.8 \text{ copies/g dw soil}$),但混种系统的 *pmoA* 基因绝对丰度($326956.6 \text{ copies/g dw soil}$)低于两物种单种系统的平均值($1043616.0 \text{ copies/g dw soil}$) ($P < 0.001$)。此外,混种系统的微生物量、植物生物量高于两物种单种系统的平均值($P < 0.01$),但出水铵态氮浓度低于两物种单种系统的平均值($P < 0.05$),出水总有机碳浓度和硝态氮浓度在单混种系统间无显著差异($P > 0.05$)。千屈菜单种系统和海寿花单种系统间的甲烷释放强度、*pmoA* 基因绝对丰度、微生物量、植物生物量和出水铵态氮浓度存在显著差异($P < 0.05$),但 *mcrA* 基因绝对丰度、出水总有机碳和硝态氮浓度无显著差异($P > 0.05$)。为了达到人工湿地的高净化效率,需要将千屈菜与海寿花混合种植,但混合种植强化甲烷释放。通过植物种类和丰富度对各指标变异的解释度(ω^2)分析发现,植物种类对甲烷释放、*pmoA* 基因绝对丰度、出水铵态氮的影响大于植物丰富度,但对 *mcrA* 基因绝对丰度的影响小于植物丰富度。

关键词: *mcrA* 基因; *pmoA* 基因; 生态系统功能; 生物多样性; 温室气体

Effects of plant species and diversity on methane emissions and functional gene abundances in constructed wetlands

SUN Hongying^{1,2,3}, XIN Quanwei¹, LIN Xingsheng¹, LUO Hailing¹, LIN Hui¹, YAN Shaojuan^{1,4}, LIU Wenli⁵, LAN Siren^{2,3,*}

1 National Engineering Research Center of Juncao, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2 Forestry Post-doctoral Station, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

3 Forestry College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

4 College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

5 School of Civil Engineering and Architecture, Taizhou University, Taizhou 318000, China

基金项目:国家自然科学基金(31500265);福建农林大学第三批科技创新专项基金;浙江省自然科学基金(LY19E090001)

收稿日期:2018-09-29; **网络出版日期:**2019-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lsr9636@163.com

Abstract: To investigate the effects of plant species and diversity on methane emissions and functional gene abundances under middle influent C/N ratio, we developed laboratory-scale constructed wetlands. Two plants, *Lythrum salicaria* and *Pontederia cordata*, which are often used in constructed wetlands and have good landscape values, were selected to establish current planting patterns, e.g. the one-species monoculturing and two-species mix culturing systems. Results showed that methane emissions from the mix culturing systems were higher ($8.78 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) than the mean values of the two monoculturing systems ($6.97 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) ($P < 0.001$). Similar to methane emissions, the absolute abundance of *mcrA* from mixed systems was also higher ($977541.6 \text{ copies/g dw soil}$) than the mean value of the two monoculturing systems ($585146.8 \text{ copies/g dw soil}$). However, the absolute abundance of *pmoA* from the mixed systems ($326956.6 \text{ copies/g dw soil}$) was lower than the mean values of the two monoculturing systems ($1043616.0 \text{ copies/g dw soil}$) ($P < 0.001$). In addition, both microbial biomass and plant biomass in the mix culturing systems were higher ($P < 0.01$), but the NH_4^+ -N concentration of effluent in the mix culturing systems was lower than the mean value of the two monoculturing systems ($P < 0.05$), and there was no significant difference in TOC and NO_3^- -N concentrations between the two systems ($P > 0.05$). There was a significant difference in the methane emission, absolute abundance of *pmoA*, microbial biomass, plant biomass, and effluent NH_4^+ -N concentration between two monoculturing systems planting with *Lythrum salicaria* and *Pontederia cordata*, but there was no significant difference in the absolute abundance of *mcrA*, effluent TOC and NO_3^- -N concentrations between the two monoculturing systems with *Lythrum salicaria* and *Pontederia cordata*. In order to achieve the high purification efficiency of constructed wetlands, it is necessary to mix planting of *Lythrum salicaria* and *Pontederia cordata*, but mix planting enhances methane release. By using the variation (ω^2), we found that although the effect of plant species on methane emissions, *pmoA* absolute abundance and effluent NH_4^+ -N concentration was greater than that of plant species richness, the effect of plant species on *mcrA* absolute abundance was smaller than the effect of plant richness.

Key Words: *mcrA* gene; *pmoA* gene; ecosystem functioning; biodiversity; greenhouse gas

人工湿地是一种强化自然过程的污水处理工程系统,通过微生物转化和植物吸收等途径去除污水中各种污染物,如碳、氮和磷等^[1]。人工湿地的建设、运行成本低,处理效果好,是一种绿色、有效的污水处理技术^[2]。虽然有很多优点,但由于污水中的碳含量较高,人工湿地也会释放一定量的甲烷^[3]。甲烷的全球变暖潜力是二氧化碳的 28 倍,是造成大气变暖的最重要的温室气体之一^[4]。此外,甲烷还通过其他化学反应对气候产生间接影响^[5]。因此,人工湿地的甲烷排放受到越来越多的关注。

甲烷排放是由甲烷产生和甲烷氧化共同决定的^[6]。在人工湿地中,植物和微生物共同作用于甲烷的产生和氧化过程。植物在甲烷排放中扮演着重要的角色(I)通过植物根系为产甲烷菌提供可用的有机碳^[7]; (II)将氧气输送到根际,从而抑制甲烷生成和增强甲烷氧化成二氧化碳^[8]; (III)通过通气组织传输甲烷^[9]。除了植物,微生物在人工湿地中起着关键作用,决定了甲烷过程速率^[10]。产甲烷菌和甲烷氧化菌分别是甲烷产生和氧化的微生物^[11]。产甲烷菌是在有机物的厌氧降解过程产生甲烷^[6],甲烷氧化菌仅利用甲烷为碳源和能源,将甲烷氧化成二氧化碳^[9]。产甲烷菌相关的甲基辅酶 M 还原酶基因(*mcrA*)和甲烷氧化菌相关的甲烷氧化单加氧酶基因(*pmoA*)作为功能基因,分别可以定量产甲烷菌和甲烷氧化菌^[6]。此外,其他因素如进水 C/N 比在甲烷排放中也起着关键作用^[12]。

一些研究发现,有植物的人工湿地系统比无植物的人工湿地系统排放更高强度的甲烷^[13],也有研究发现人工湿地植物种类对甲烷排放有不同影响^[6]。一些植物会促进甲烷排放,另一些植物会减少甲烷排放^[14]。这些结果可能是由于不同的植物种类造成的,因为植物可以为微生物提供氧气和有机物^[15],调节甲烷过程。不同植物的代谢周期、氧气释放及通气组织结构和数量可能不同^[16-17]。最近,在人工湿地中增加了植物多样性设计,表明植物多样性提高氮去除效率^[18-20],增强微生物生物量和酶活性^[21]、增加植物生物量^[20, 22]。然而,据我们所知,只有少数研究关注植物多样性对甲烷排放的影响,并且,植物多样性对甲烷排放的影响还存

在争议。一项研究发现植物多样性促进甲烷排放^[23],而另外两项研究发现植物多样性不影响甲烷排放^[20, 24]。所有这些研究都只测定了人工湿地甲烷释放强度,未涉及甲烷过程相关功能基因等机理方面的内容,也未分析植物丰富度与植物种类对甲烷释放的相对贡献比例,而且这些研究都是在低碳氮比水平($C/N < 1:1$)的生境中进行的。入水碳氮比在微生物和甲烷排放中起着至关重要的作用。许多研究表明,中等比例的 C/N 比最有利于人工湿地甲烷的低水平排放和高营养去除^[12, 25, 26]。目前尚不清楚,在 C/N 比率处于中间水平的生境中,植物多样性对人工湿地甲烷排放及其功能基因丰度的影响。

针对上述问题,我们在中国东南部的福建省福州市福建农林大学构建了实验尺度的人工湿地微宇宙系统,配置了千屈菜单种系统、海寿花单种系统、千屈菜和海寿花混种系统,研究(1)人工湿地处理中 C/N 比废水时,植物多样性是否影响系统甲烷排放?(2)人工湿地处理中 C/N 比废水时,植物多样性是否影响产甲烷菌和甲烷氧化菌的功能基因丰度?(3)如果植物多样性影响系统甲烷排放,植物丰富度与植物种类对甲烷释放的相对贡献比例如何?(4)如果植物多样性影响系统甲烷排放,甲烷排放是否与产甲烷菌功能基因丰度、甲烷氧化菌功能基因丰度和系统氮去除效率一致。

1 材料与方法

1.1 实验设计

2017 年 1—9 月,在福建省福州市福建农林大学校园实验基地($120^{\circ} 05' E, 30^{\circ} 18' N$)设计了一套垂直流人工湿地微宇宙系统。为保证植物根系有充足的生长空间,人工湿地微宇宙采用正方体设计(长 $\times$ 宽 $\times$ 高 = $45\text{ cm} \times 45\text{ cm} \times 45\text{ cm}$),并填充用自来水清洗过的河沙作为培养基质,填充深度为 30 cm 。选取了千屈菜(*Lythrum salicaria* L.)和海寿花(*Pontederia cordata* L.)2 种人工湿地常用、景观效果好的植物。2017 年 3 月初,从园艺公司购买了两种植物的幼苗。选取生长健壮、株高、体积、长势基本一致的幼苗,分别配置了 2 个单种处理和 1 个两物种混种处理,每个处理重复 3 次。每个人工湿地微宇宙系统随机种植 12 棵植物,混种系统中的两种植物随机分布且棵数相同,均为 6 棵。

本实验用的模拟污水是在霍格兰营养液的基础上加以调整,即无机氮浓度为 112 mg/L ,硝铵比为 $1:1$ 。在此基础上,我们添加葡萄糖作为碳源,碳氮比为 $5:1$ 。依据人工湿地的水力停留时间,我们每 10 d 注入一次污水,使水面高于沙面 5 cm 。

1.2 取样与分析

采用国际通用的静态气密箱和气象色谱技术检测系统的甲烷通量。气密箱是由聚氯乙烯材料定制的圆柱箱体,其尺寸(高 120 cm ,直径 44 cm)是根据本实验人工湿地微宇宙的尺度和所种植植物的高度确定。按照 Zhang et al. (2012)^[23]的方法,我们于 2017 年 8 月 26 日,采集了每个人工湿地微宇宙的气体样品。气体样品在气象色谱 7890B(Agilent 7890B, USA)上测定。

2017 年 8 月 27 日,我们依次打开每个微宇宙系统的出水开关,收集出水样品。水样暂存于 4°C 冰箱,用于测定水样中的碳氮浓度。随后,从各个微宇宙系统收获整株植物样品。之后,采集每个微宇宙系统的基质样品,每个系统随机采集 5 个点,然后混合成一个基质样品。基质样品暂存于 4°C 冰箱和 -20°C 冰柜中,分别用于定量基质中微生物生物量和甲烷功能基因。植物样品于 65°C 烘干至恒重,用于计算植物生物量。基质微生物生物量采用氯仿熏蒸-总有机碳分析仪(TOC-L, Japan)测定。水样中的硝态氮和铵态氮浓度用全自动间断分析仪(Smart Chen 200, Italy)测定,水样中的总有机碳浓度用总有机碳分析仪(TOC-L, Japan)测定。

1.3 DNA 提取与实时荧光定量 PCR

用 Soil DNA kits DcP336 (TIANGEN, China)试剂盒提取和纯化基质样品基因组 DNA,具体方法步骤参照试剂盒说明。用 1%琼脂糖凝胶电泳对所提取的基质 DNA 样品质量进行检测。基质 DNA 样品暂存于 -20°C 冰箱保存,待分析。

对基质样品中的产甲烷菌相关的甲基辅酶 M 还原酶基因(*mcrA*)和甲烷氧化菌相关的甲烷氧化单加氧酶

基因 α 亚基 (*pmoA*) 进行绝对定量分析。用于 *mcrA* 基因扩增的引物序列分别为 *mcrA* 上游引物 5'-CAAAGGGAACCCAGGAAGT-3' 和 *mcrA* 下游引物 5'-GCAGGTCGTAGCCGAAGA-3'。用于 *pmoA* 基因扩增的引物序列分别为上游引物 5'-GGNGACTGGGACTTCT- GG-3' 和下游引物 5'-GGTAARGACGTTGCNCCGG-3'。

利用 ABI7500 (Applied Biosystems, USA) 测定产甲烷菌 *mcrA* 基因和甲烷氧化菌 *pmoA* 基因的拷贝数。简短的讲就是:反应体系 (20 μ L): 10 μ L 2 $\times$ Master Mix, 0.5 μ L 上游特异引物 (10 μ M), 0.5 μ L 下游特异引物 (10 μ M), 2 μ L DNA 模板, 7 μ L 水。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 40 个 PCR 循环 (95 $^{\circ}$ C, 5 s, 60 $^{\circ}$ C, 40 s (收集荧光))。为了建立 PCR 产物的溶解曲线, 扩增反应结束后, 按 (95 $^{\circ}$ C, 10 s, 60 $^{\circ}$ C, 60 s, 95 $^{\circ}$ C, 15 s), 并从 60 $^{\circ}$ C 缓慢加热到 99 $^{\circ}$ C (仪器自动进行-Ramp Rate 为 0.05 $^{\circ}$ C / s)。最后结合土壤干土百分数计算基因拷贝数 (copies/g dried weight (dw) soil)。

1.4 植物丰富度和植物种类对各响应变量的相对贡献分析

参照 Graham et al. (2001) [27] 和 Duffy et al. (2005) [28] 方法, 对混种系统与单种系统有显著差异的指标进行植物丰富度和植物种类的相对贡献分析, 即先进行单因素方差分析再将该平方和分为单种与混种之间的先验对比, 即丰富度效应, 剩余平方和代表植物种类的效应, 这两种效应使用方差分析中误差的均方 MS 作为 F 检验的分母, 计算植物种类和丰富度效应的大小, ω^2 表示植物种类或丰富度对总变异的解释度, ω^2 的数值越大表示植物种类或丰富度的作用越强。

1.5 统计分析

所有数据统计分析均在 SPSS 16.0 中完成, 所有数据均用平均值 $\pm$ 标准误表示。采用单因素方差分析比较植物单种系统与混种系统各指标是否存在差异 ($P = 0.05$), 若差异显著则进行多重比较 (Tukey method)。

2 结果与分析

2.1 植物种类和多样性对甲烷释放及功能基因丰富的影响

千屈菜单种系统和海寿花单种系统间的甲烷释放强度分别为 5.42 $\text{mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ 和 8.51 $\text{mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, 两系统间存在显著差异 (图 1 A, $P < 0.001$)。千屈菜与海寿花混种系统的甲烷释放强度高于两物种单种系统的平均值, 其释放强度分别为 8.78 $\text{mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ 和 6.97 $\text{mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (图 1 B, $P < 0.001$)。此外, 混种系统的甲烷释放强度显著高于千屈菜单种系统, 但与海寿花单中系统间无显著差异 (图 1 C, $P < 0.001$)。通过植物种类和丰富度对甲烷释放变异的解释度 (ω^2) 发现, 植物种类和丰富度分别解释变异的 66.0% 和 29.9% (表 1), 说明植物种类对甲烷释放的影响大于植物丰富度。

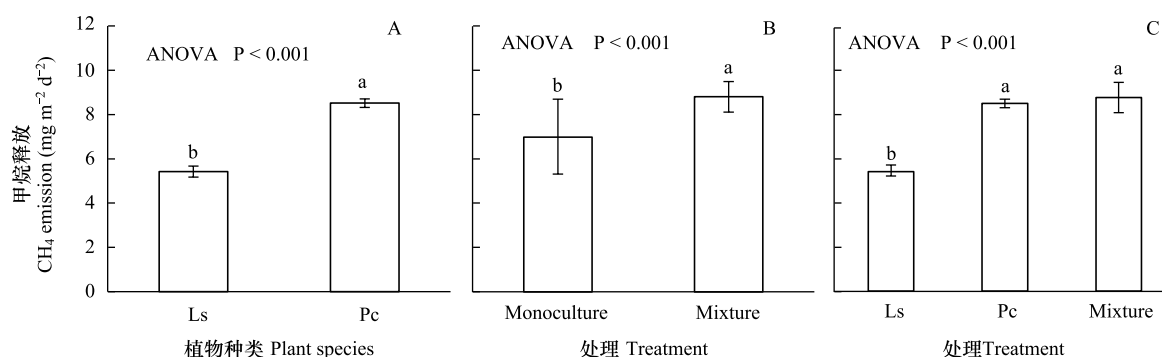


图 1 植物种类 (A)、多样性 (B) 和植物种类与多样性 (C) 对甲烷释放的影响

Fig.1 Effects of plant species (A), diversity (B), plant species and diversity (C) on methane emission

植物种类简写: Ls (千屈菜), *Lythrum salicaria*; Pc (海寿花), *Pontederia cordata*

千屈菜单种系统和海寿花单种系统间的 *mcrA* 基因绝对丰度分别为 410355.2 copies $\text{g}^{-1} \text{ dw soil}$ 和 759938.3 copies/g dw soil, 但两系统间无显著差异 (图 2 A, $P > 0.05$)。千屈菜与海寿花混种系统的 *mcrA* 基因

绝对丰度高于两物种单种系统的平均值,其绝对丰度分别为 977541.6 copies/g dw soil 和 585146.8 copies/g dw soil(图 2 B, $P < 0.001$)。通过植物种类和丰富度对 *mcrA* 基因绝对丰度变异的解释度(ω^2)发现,植物种类和丰富度分别解释变异的 36.8%和 61.9%(表 1),说明植物丰富度对 *mcrA* 基因绝对丰度的影响大于植物种类。

表 1 植物种类及丰富度对各参数影响的相对贡献

Table 1 The relative contributions of plant species and species richness on various parameters in constructed wetlands							
参数 Parameter	效应源 Sources of effect	离均差平方和 SS	自由度 <i>df</i>	均方 MS	F 值	P 值	变异的解释度 ω^2
甲烷释放 CH ₄ emission	Richness	6.607	1	6.607	33.882	0.001	0.299
	Identity	14.365	1	14.365	73.667	<0.001	0.660
<i>McrA</i> 丰度 <i>McrA</i> abundance	Richness	3.079×10 ¹¹	1	3.08×10 ¹¹	208.322	<0.001	0.619
	Identity	1.834×10 ¹¹	1	1.83×10 ¹¹	124.087	<0.001	0.368
<i>PmoA</i> 丰度 <i>PmoA</i> abundance	Richness	1.027×10 ¹²	1	1.03×10 ¹²	1622.430	<0.001	0.239
	Identity	3.272×10 ¹²	1	3.27×10 ¹²	5169.040	<0.001	0.761
氨氮浓度 NH ₄ ⁺ -N concentration	Richness	13.574	1	13.574	7.385	0.035	0.128
	Identity	73.342	1	73.342	39.903	<0.001	0.781
微生物量 Microbial biomass	Richness	1263.017	1	1263.017	18.041	0.005	0.176
	Identity	5343.818	1	5343.818	76.329	<0.001	0.778
植物生物量 Plant biomass	Richness	3.818	1	3.818	4.404	0.081	0.048
	Identity	55.990	1	55.990	64.579	<0.001	0.889

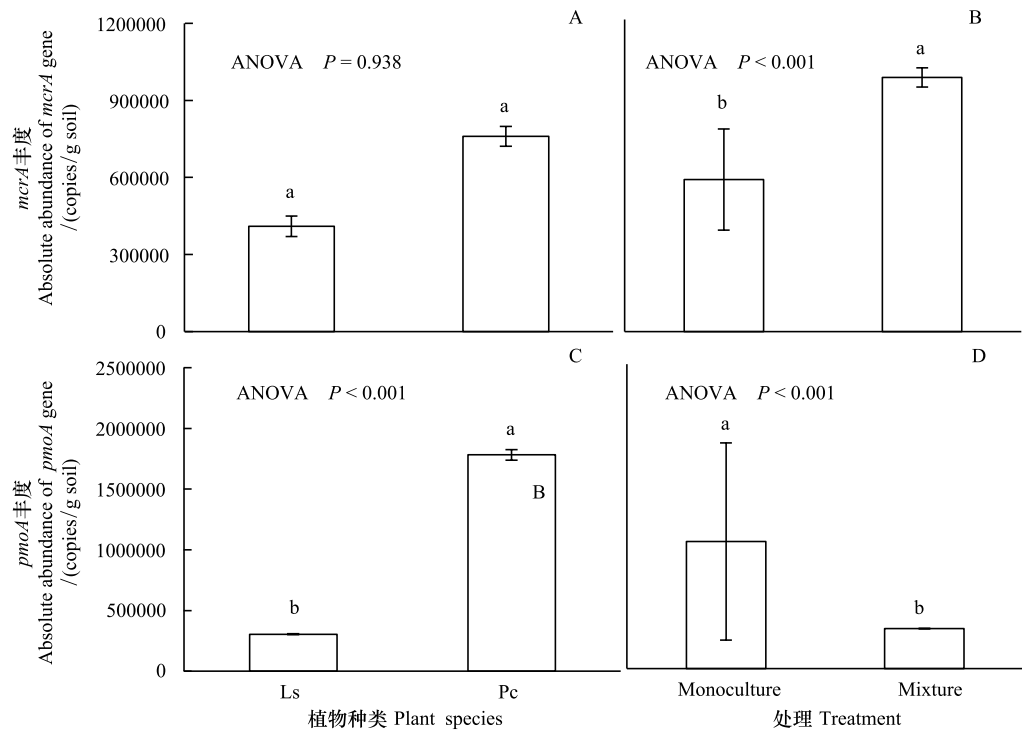


图 2 植物种类对 *mcrA* (A) 和 *pmoA* (C) 绝对丰度的影响与植物多样性对 *mcrA* (B) 和 *pmoA* (D) 绝对丰度的影响

Fig.2 Effects of plant species on absolute abundance of *mcrA* (A) and *pmoA* (C) gene and plant diversity on absolute abundance of *mcrA* (B) and *pmoA* (D) gene

千屈菜单种系统和海寿花单种系统间的 *pmoA* 基因绝对丰度有显著差异,分别为 305145.3 copies g⁻¹ dw soil 和 1782087.6 copies g⁻¹ dw soil(图 2 C, $P < 0.001$)。千屈菜与海寿花混种系统的 *pmoA* 基因绝对丰度低于两物种单种系统的平均值,其绝对丰度分别为 326956.6 copies g⁻¹ dw soil 和 1043616.0 copies g⁻¹ dw soil(图 2

D, $P < 0.001$)。通过植物种类和丰富度对 *pmoA* 基因绝对丰度变异的解释度(ω^2)发现,植物种类和丰富度分别解释变异的 76.1% 和 23.9% (表 1),说明植物种类对 *pmoA* 基因绝对丰度的影响大于植物丰富度。

2.2 植物种类和多样性对微生物与植物生物量的影响

千屈菜单种系统和海寿花单种系统间的微生物量存在显著差异,分别为 32.98 mg/kg 和 92.67 mg/kg (图 3 A, $P < 0.01$)。千屈菜与海寿花混种系统的微生物量高于两物种单种系统的平均值,其微生物量分别为 87.95 mg/kg 和 62.82 mg/kg (图 3 B, $P < 0.01$)。通过植物种类和丰富度对微生物量变异的解释度(ω^2)发现,植物种类和丰富度分别解释变异的 77.8% 和 17.6% (表 1),说明植物种类对微生物量的影响大于植物丰富度。

千屈菜单种系统和海寿花单种系统间的植物生物量存在显著差异,分别为 1.74 mg/kg 和 7.85 mg/kg (图 3 C, $P < 0.01$)。千屈菜与海寿花混种系统的植物生物量高于两物种单种系统的平均值,其生物量分别为 6.17 mg/kg 和 4.79 mg/kg (图 3 D, $P < 0.01$)。通过植物种类和丰富度对植物生物量变异的解释度(ω^2)发现,植物种类和丰富度分别解释变异的 88.9% 和 4.8% (表 1),说明植物种类对植物生物量的影响大于植物丰富度。

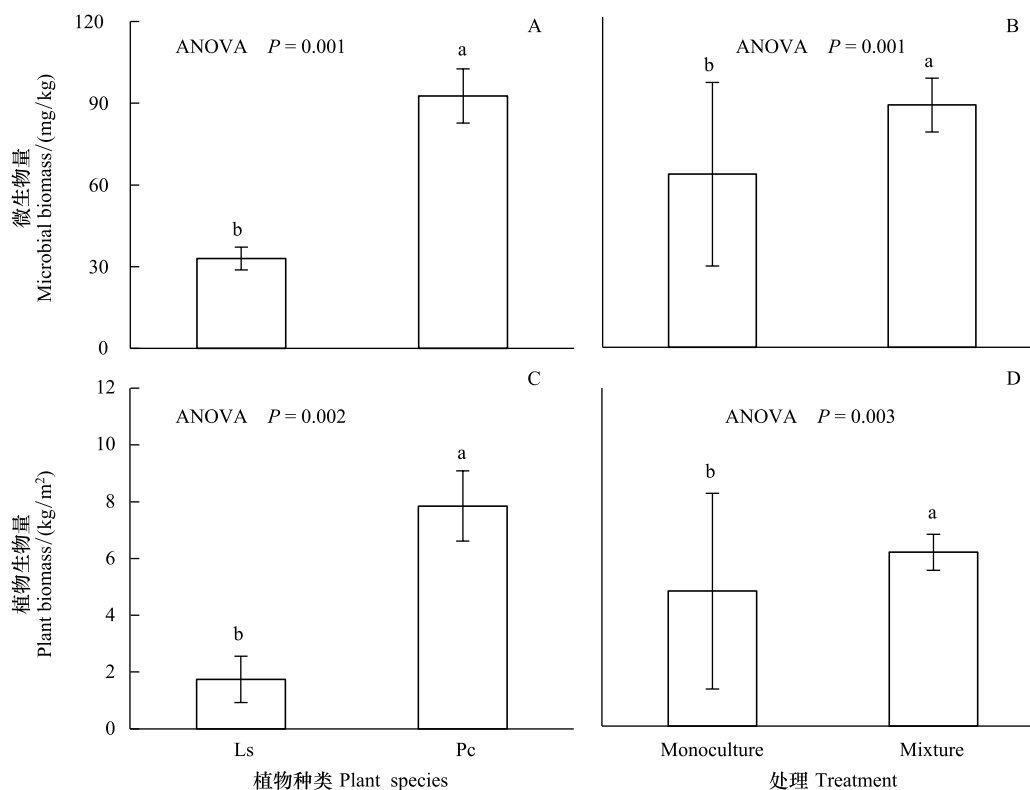


图 3 植物种类对微生物量碳(A)和植物生物量(C)的影响与植物多样性对微生物量碳(B)和植物生物量(D)的影响

Fig.3 Effects of plant species on microbial biomass carbon (A) and plant biomass (C) and plant diversity on microbial biomass carbon (B) and plant biomass (D)

2.3 植物种类和多样性对碳氮移除的影响

千屈菜单种系统和海寿花单种系统间的出水总有机碳浓度分别为 12.33 mg/kg 和 10.84 mg/kg,但两系统间无显著差异(图 4 A, $P > 0.05$)。千屈菜与海寿花混种系统的出水总有机碳浓度低于两物种单种系统的平均值,但差异不显著,其出水总有机碳浓度分别为 8.54 mg/kg 和 11.59 mg/kg (图 4 B, $P > 0.05$)。

千屈菜单种系统和海寿花单种系统间的出水铵态氮浓度有显著差异,分别为 10.02 mg/L 和 3.03 mg/L (图 5 A, $P < 0.01$)。千屈菜与海寿花混种系统的出水铵态氮浓度低于两物种单种系统的平均值,其出水铵态氮浓度分别为 3.92 mg/L 和 6.52 mg/L (图 5 B, $P < 0.05$)。通过植物种类和丰富度对出水铵态氮浓度变异的

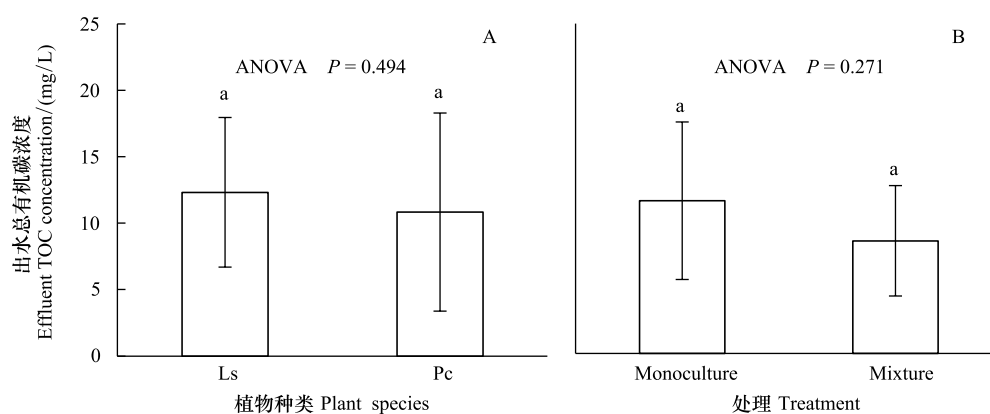


图4 植物种类(A)和多样性(B)对出水TOC浓度的影响

Fig.4 Effects of plant species (A) and diversity (B) on effluent TOC concentration

解释度(ω^2)发现,植物种类和丰富度分别解释变异的78.1%和12.8%(表1),说明植物种类对出水铵态氮浓度的影响大于植物丰富度。

千屈菜单种系统和海寿花单种系统间的出水硝态氮浓度分别为20.69 mg/L和16.51 mg/L,但两系统间无显著差异(图5 C, $P > 0.05$)。千屈菜与海寿花混种系统的出水硝态氮浓度低于两物种单种系统的平均值,但差异不显著,其出水硝态氮浓度分别为16.29 mg/L和18.60 mg/L(图5 D, $P > 0.05$)。

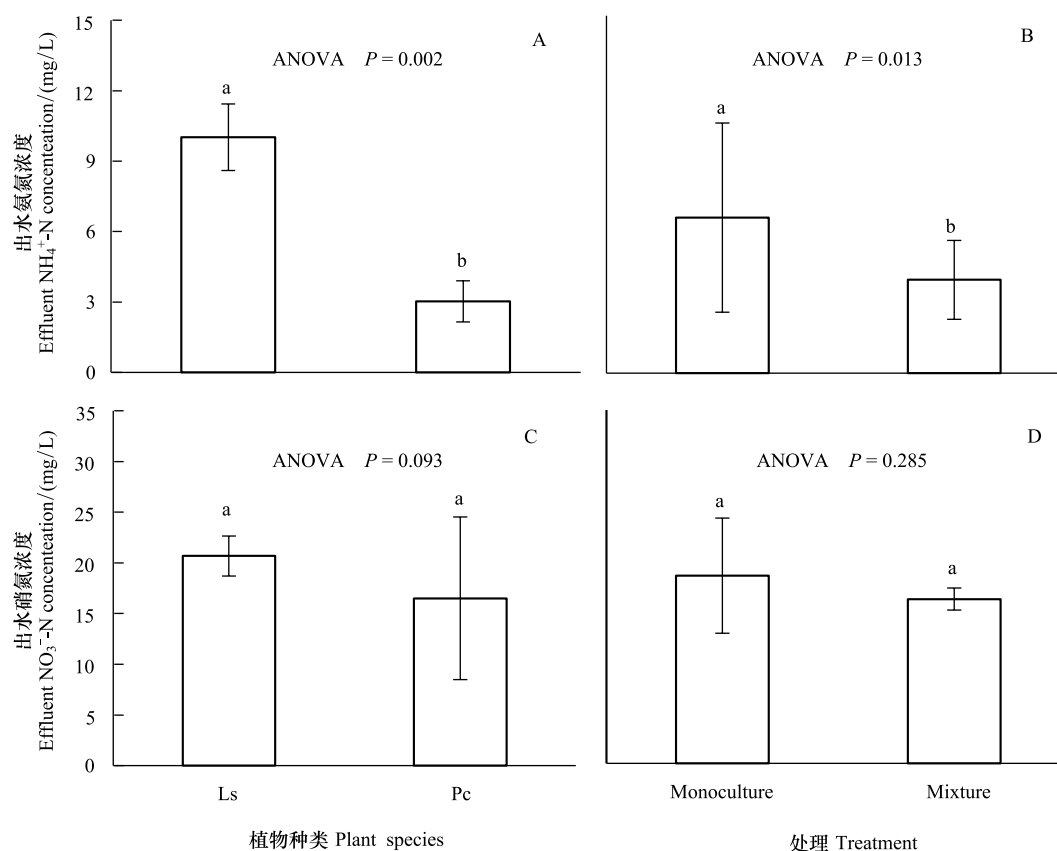


图5 植物种类对出水铵态氮(A)和硝态氮(C)的影响与植物多样性对出水铵态氮(B)和硝态氮(D)的影响

Fig.5 Effects of plant species on effluent NH₄⁺-N (A) and NO₃⁻-N (C) and plant diversity on effluent NH₄⁺-N (B) and NO₃⁻-N (D)

3 讨论

甲烷是系统碳转化过程的产物之一,甲烷排放主要由植物和微生物过程驱动^[6]。在本研究中,海寿花单种系统的甲烷释放强度显著高于千屈菜单种系统,并且千屈菜与海寿花混种系统的甲烷释放强度($8.78 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)高于两物种单种系统的平均值($6.97 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$),说明增加植物多样性有利于提高人工湿地系统的甲烷释放强度,植物多样性对人工湿地系统的甲烷释放强度有正效应,同时植物种类也显著影响系统甲烷释放。支持了 Zhang et al. (2012)^[23] 的研究结论,植物多样性对甲烷释放具有促进作用。Zhang et al. (2012)^[23] 将多样性对甲烷释放的促进作用解释为植物生物量对甲烷的促进作用和多样性条件下互补效应导致甲烷的超排放效应。本研究,我们发现混种系统的植物生物量显著高于单种系统,混种增加的植物生物量会通过根系向基质释放更多的有机碳,这些有机碳被产甲烷菌转化成甲烷而促进甲烷的产生^[11],因此,植物多样性对甲烷释放的正效应可能与多样性对植物生物量的正效应有关。然而,我们发现混种系统甲烷释放强度与单种系统甲烷释放强度的最高值(海寿花单种系统)之间无显著差异,说明本研究中多样性高的系统并未出现甲烷的超排放效应,即不存在互补效应,与 Zhang et al. (2012)^[23] 的研究结果不同。这可能与人工湿地系统处理的污水成分有关,本研究污水的碳氮比为 5:1,产甲烷菌可能主要利用污水中的碳,但 Zhang et al. (2012)^[23] 所处理的污水中未添加任何碳,也就是说产甲烷菌利用的碳完全依赖于植物供给的碳,这部分植物碳可能被产甲烷菌互补利用导致甲烷的超排放效应。此外,为了更好地解释植物多样性对甲烷释放的效应,我们除了同前人的研究一样,测定了多样性条件下的植物生物量和超排放效应外^[20, 23],还检测了与甲烷释放直接相关的微生物。产甲烷菌和甲烷氧化菌是甲烷产生和氧化过程涉及的两类微生物^[11]。由于分子生物学技术的发展,产甲烷菌和甲烷氧化菌的数量可以分别由功能基因 *mcrA* 和 *pmoA* 来定量^[6]。与传统的微生物培养计数相比,实时荧光定量 PCR 方法不仅省时、省力,而且准确率更高。然而,在人工湿地中,基于植物多样性栽培条件下,用定量 PCR 技术探讨甲烷排放与产甲烷菌和甲烷氧化菌功能基因关系的研究却很少。本研究,千屈菜与海寿花混种提高了 *mcrA* 基因绝对丰度($P < 0.001$),但却降低了 *pmoA* 基因绝对丰度($P < 0.001$)。*mcrA* 基因通过产甲烷菌的转化过程催化甲烷的产生^[6],因此,混种对甲烷释放的正效应可能主要取决于产甲烷菌对产甲烷的正效应。另一方面,人工湿地产甲烷菌产生的甲烷有一部分未到达大气之前被甲烷氧化菌氧化成二氧化碳^[9]。本研究中,混种系统较高的产甲烷菌数量、较低的甲烷氧化菌数量与较高的甲烷释放强度一致。因此,混种对甲烷释放的正效应也可能与甲烷氧化菌对甲烷氧化的负效应有关。

与甲烷释放相反,混种降低了出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度($P < 0.05$),说明混种对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除有正效应。人工湿地氮去除主要靠微生物转化和植物吸收^[29]。本研究,混种对微生物量和植物生物量均有正效应($P < 0.01$)。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 转化成 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 依靠微生物中的硝化细菌实现^[30],由于混种强化了微生物量,而硝化细菌是其中的一类微生物,推测混种也可能增强了硝化细菌量。因此,混种对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除的正效应可能与硝化细菌有关。植物根系对氮的吸收是人工湿地氮去除的重要途径^[24]。因此,混种对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除的正效应也可能与植物通过根系吸收 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 构建自身组织有关。此外,混种还可能对氮的互补利用效应。然而,混种没有显著影响出水 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度($P > 0.05$),说明混种对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 去除无效应。这可能与植物对氮的偏好吸收利用有关,因为不同氮形态影响植物生长,一些植物偏好吸收 $\text{NH}_4^+\text{-N}$,如芦苇、水甜茅、黑麦草、茶树^[31-33],另一些植物偏好吸收 $\text{NO}_3^-\text{-N}$,如番茄、豌豆^[34-35]。此外,还可能与混种强化 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 转化成 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 有关。本研究,混种降低了出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度,也就是说,与单种处理相比,混种将更多的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 转化成 $\text{NO}_3^-\text{-N}$,混种系统的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比单种系统高,即使混种系统的反硝化作用强于单种系统,表现在出水 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度上,混种系统与单种系统的出水 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度也可能没有差异。

4 结论

本研究探究了植物多样性对人工湿地甲烷释放及其功能基因的影响,拓展了生物多样性与生态系统功能

研究的内容和深度。研究表明,植物多样性强化甲烷释放强度、*mcrA* 基因绝对丰度、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除效率,但降低 *pmoA* 基因绝对丰度,没有影响 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 TOC 去除效率。植物种类比丰富度对甲烷释放、*pmoA* 基因绝对丰度、铵态氮去除的影响更大。千屈菜单种具有甲烷释放低、氮去除率低的特征,从甲烷释放角度考虑是一个好的工具种;海寿花单种具有甲烷释放高、氮去除率高的特征,从氮净化角度讲是一个好的工具种。然而,为了达到人工湿地的高净化效率,需要将千屈菜与海寿花混合种植,但混合种植强化甲烷释放。本研究综合考虑植物种类和丰富度带来的生态效应,对人工湿地植物配置具有指导意义。由于研究空间的局限,本研究仅配置了 2 个植物种类及其混种栽培模式。但为了更好的研究生物多样性效应,未来应该在更高多样性水平下开展相关研究。

参考文献 (References):

- [1] Vymazal J. Constructed wetlands for wastewater treatment: five decades of experience. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(1): 61-69.
- [2] Du Y Y, Pan K X, Yu C C, Luo B, Gu W L, Sun H Y, Min Y, Liu D, Geng Y, Han W J, Chang S X, Liu Y, Li D, Ge Y, Chang J. Plant diversity decreases net global warming potential integrating multiple functions in microcosms of constructed wetlands. *Journal of Cleaner Production*, 2018, 184: 718-726.
- [3] Liu D, Wu X, Chang J, Gu B J, Min Y, Ge Y, Shi Y, Xue H, Peng C H, Wu J G. Constructed wetlands as biofuel production systems. *Nature Climate Change*, 2012, 2(3): 190-194.
- [4] IPCC. Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2014.
- [5] Frankenberg C, Meirink J F, van Weele M, Platt U, Wagner T. Assessing methane emissions from global space-borne observations. *Science*, 2005, 308(5724): 1010-1014.
- [6] Zhang K, Liu Y H, Chen Q, Luo H B, Zhu Z Y, Chen W, Chen J, Mo Y. Effect of submerged plant species on CH_4 flux and methanogenic community dynamics in a full-scale constructed wetland. *Ecological Engineering*, 2018, 115: 96-104.
- [7] Ström L, Tagesson T, Mastepanov M, Christensen T R. Presence of *Eriophorum scheuchzeri* enhances substrate availability and methane emission in an Arctic wetland. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 45: 61-70.
- [8] Faußer A, Dušek J, Čížková H, Hoppert M, Walther P, Kazda M. Internal oxygen dynamics in rhizomes of *Phragmites australis* and presence of methanotrophs in root biofilms in a constructed wetland for wastewater treatment. *Desalination and Water Treatment*, 2013, 51(13/15): 3026-3031.
- [9] Chen H, Zhu Q A, Peng C H, Wu N, Wang Y F, Fang X Q, Jiang H, Liang W H, Chang J, Deng X W, Yu G R. Methane emissions from rice paddies natural wetlands, lakes in China: synthesis new estimate. *Global Change Biology*, 2013, 19(1): 19-32.
- [10] Godin A, McLaughlin J W, Webster K L, Packalen M, Basiliko N. Methane and methanogen community dynamics across a boreal peatland nutrient gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 48: 96-105.
- [11] Ramakrishnan B, Lueders T, Dunfield P F, Conrad R, Friedrich M W. Archaeal community structures in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 37(2): 175-186.
- [12] Yan C, Zhang H, Li B, Wang D, Zhao Y J, Zheng Z. Effects of influent C/N ratios on CO_2 and CH_4 emissions from vertical subsurface flow constructed wetlands treating synthetic municipal wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 203-204: 188-194.
- [13] McInerney E, Helton A M. The effects of soil moisture and emergent herbaceous vegetation on carbon emissions from constructed wetlands. *Wetlands*, 2016, 36(2): 275-284.
- [14] Maucieri C, Barbera A C, Vymazal J, Borin M. A review on the main affecting factors of greenhouse gases emission in constructed wetlands. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2017, 236: 175-193.
- [15] Fu G P, Huangshen L K, Guo Z P, Zhou Q H, Wu Z B. Effect of plant-based carbon sources on denitrifying microorganisms in a vertical flow constructed wetland. *Bioresource Technology*, 2017, 224: 214-221.
- [16] Philippot L, Hallin S, Börjesson G, Baggs E M. Biochemical cycling in the rhizosphere having an impact on global change. *Plant and Soil*, 2009, 321(1/2): 61-81.
- [17] Ge Y, Zhang C B, Jiang Y P, Yue C L, Jiang Q S, Min H, Fan H T, Zeng Q, Chang J. Soil microbial abundances and enzyme activities in different rhizospheres in an integrated vertical flow constructed wetland. *Clean - Soil, Air, Water*, 2011, 39(3): 206-211.
- [18] Ge Y, Han W J, Huang C C, Wang H, Liu D, Chang S X, Gu B H, Zhang C B, Gu B J, Fan X, Du Y Y, Chang J. Positive effects of plant diversity on nitrogen removal in microcosms of constructed wetlands with high ammonium loading. *Ecological Engineering*, 2015, 82: 614-623.

- [19] Luo B, Ge Y, Han W J, Fan X, Ren Y, Du Y Y, Shi M M, Chang J. Decreases in ammonia volatilization in response to greater plant diversity in microcosms of constructed wetlands. *Atmospheric Environment*, 2016, 142: 414-419.
- [20] Han W J, Shi M M, Chang J, Ren Y, Xu R H, Zhang C B, Ge Y. Plant species diversity reduces N_2O but not CH_4 emissions from constructed wetlands under high nitrogen levels. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(6): 5938-5948.
- [21] Zhang C B, Liu W L, Wang J, Chen T, Yuan Q Q, Huang C C, Ge Y, Chang S X, Chang J. Plant functional group richness affected microbial community structure and function in a full-scale constructed wetland. *Ecological Engineering*, 2011, 37(9): 1360-1368.
- [22] Sun H Y, Zhang C B, Song C C, Chang S X, Gu B J, Chen Z X, Peng C H, Chang J, Ge Y. The effects of plant diversity on nitrous oxide emissions in hydroponic microcosms. *Atmospheric Environment*, 2013, 77: 544-547.
- [23] Zhang C B, Sun H Y, Ge Y, Gu B J, Wang H, Chang J. Plant species richness enhanced the methane emission in experimental microcosms. *Atmospheric Environment*, 2012, 62: 180-183.
- [24] Zhao Z Y, Chang J, Han W J, Wang M, Ma D P, Du Y Y, Qu Z L, Chang S X, Ge Y. Effects of plant diversity and sand particle size on methane emission and nitrogen removal in microcosms of constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 2016, 95: 390-398.
- [25] Huang W, Zhao Y J, Wu J T, Zhang J B, Zheng Z. Effects of different influent C/N ratios on the performance of various earthworm eco-filter systems: nutrient removal and greenhouse gas emission. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(1): 109-118.
- [26] Ding X W, Xue Y, Zhao Y, Xiao W H, Liu Y, Liu J G. Effects of different covering systems and carbon nitrogen ratios on nitrogen removal in surface flow constructed wetlands. *Journal of Cleaner Production*, 2018, 172: 541-551.
- [27] Graham M H, Edwards M S. Statistical significance versus fit: estimating the importance of individual factors in ecological analysis of variance. *Oikos*, 2001, 93(3): 505-513.
- [28] Duffy J E, Richardson J P, France K E. Ecosystem consequences of diversity depend on food chain length in estuarine vegetation. *Ecology Letters*, 2005, 8(3): 301-309.
- [29] Chang J, Fan X, Sun H Y, Zhang C B, Song C C, Chang S X, Gu B J, Liu Y, Li D, Wang Y, Ge Y. Plant species richness enhances nitrous oxide emissions in microcosms of constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 2014, 64: 108-115.
- [30] Zhi W, Ji G D. Quantitative response relationships between nitrogen transformation rates and nitrogen functional genes in a tidal flow constructed wetland under C/N ratio constraints. *Water Research*, 2014, 64: 32-41.
- [31] Tylova-Munzarova E, Lorenzen B, Brix H, Votruba O. The effects of NH_4^+ and NO_3^- on growth, resource allocation and nitrogen uptake kinetics of *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *Aquatic Botany*, 2005, 81(4): 326-342.
- [32] Ruan J Y, Gerendás J, Härdter R, Sattelmacher B. Effect of nitrogen form and root-zone pH on growth and nitrogen uptake of tea (*Camellia sinensis*) plants. *Annals of Botany*, 2007, 99(2): 301-310.
- [33] Cao H Q, Ge Y, Liu D, Cao Q J, Chang S X, Chang J, Song X L, Lin X. Nitrate/ammonium ratios affect ryegrass growth and nitrogen accumulation in a hydroponic system. *Journal of Plant Nutrition*, 2010, 34(2): 206-216.
- [34] Lasa B, Frechilla S, Lamsfus C, Aparicio-Tejo P M. The sensitivity to ammonium nutrition is related to nitrogen accumulation. *Scientia Horticulturae*, 2001, 91(1/2): 143-152.
- [35] Li J, Zhou J M, Duan Z Q. Effects of elevated CO_2 concentration on growth and water usage of tomato seedlings under different ammonium/nitrate ratios. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19(9): 1100-1107.