

生态修复水生植物根际氨氧化细菌的研究

邢鹏¹, 孔繁翔^{1*}, 陈开宁¹, 陈美军^{1,2}, 吴晓东^{1,2}

(1. 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:为研究水生植被恢复对底泥氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)种群的影响, 选取在生态修复中广泛使用的 4 种水生植物, 芦苇(*Phragmites communis*)、窄叶香蒲(*Typha angustifolia* L.)、菹草(*Potamogeton crispus* L.)和荇菜(*Limnathemum nymphoides*), 采用最大可能数法(most probable number, MPN)计数 AOB 的数量, 巢式聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(nested polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, nested PCR-DGGE)及条带回收测序的方法分析 AOB 的主要种类. 结果显示, 水生植物根际 AOB 密度显著高于无水生植物的表层底泥, 而芦苇(2.8×10^5 cells/g)和菹草(4.3×10^5 cells/g)又明显高于荇菜(9.3×10^4 cells/g)和荇菜(7.7×10^4 cells/g). 水生植物根际呈氧化环境, 而 NH_4^+ 的浓度低于无水生植物的对照区. DNA 测序结果显示尽管不同植物根际 AOB 主要种类有所区别, 但基本属于亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*). 此类微生物群落在水生植物根际的聚集对促进生态修复中 N 元素的循环具有重要作用.

关键词:氨氧化细菌; 生态修复; 水生植物; 根际; PCR-DGGE

中图分类号: X17 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)08-2154-06

Ammonia-Oxidizing Bacteria Community Composition at the Root Zones of Aquatic Plants after Ecological Restoration

XING Peng¹, KONG Fan-xiang¹, CHEN Kai-ning¹, CHEN Mei-jun^{1,2}, WU Xiao-dong^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: To investigate the effects of aquatic plants on ammonia-oxidizing bacteria (AOB) at their root zones, four species of aquatic plants were selected, *Phragmites communis*, *Typha angustifolia* L., *Potamogeton crispus* L., and *Limnathemum nymphoides*, which were widely used in ecological restorations. AOB in the samples were enumerated by most-probable-number (MPN) method. Nested polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) procedures were performed with ammonia oxidizer-selective primers. Main DGGE bands were excised from the gel and sequenced for phylogenetic affiliation. Results indicate that AOB densities are always higher at the root zones of emergent plants (*Phragmites communis* 2.8×10^5 cells/g and *Typha angustifolia* L. 4.3×10^5 cells/g) than those of submerged and floating-leaved plant (*Potamogeton crispus* L. 9.3×10^4 cells/g and *Limnathemum nymphoides* 7.7×10^4 cells/g). At the root zones, the oxidation-reduction potential is above zero and NH_4^+ concentration is lower than it in the bare surface sediment. Fourteen major bands were recovered from the DGGE gel, re-amplified and sequenced. Although the identified bands have their respective similar sequences in GenBank, most of them are related to *Nitrosomonas*-like. This type of bacteria would play an important role of nitrogen cycle in lake sediment after ecological restoration.

Key words: ammonia-oxidizing bacteria; ecological restoration; aquatic plant; root zone; PCR-DGGE

高等水生植物已被广泛应用于水体生态系统修复工程中^[1]. 尽管根系着生在底泥中的水生植物可以通过其根茎部分吸收氮磷, 以减轻底泥及水体中的污染负荷, 但是大量物质衡算结果显示, 在 N 的去除机制上占主导地位的并不是水生植物的吸收作用, 而是细菌的分解转化作用^[2,3]. 植物根系的分泌物可以为细菌提供必需的营养, 因此水生植物根际成为微生物集中和活跃的区域^[4,5]. 研究表明, 由于植物的存在而形成的根际微生态环境, 对于只能由细菌完成的硝化和反硝化过程具有重要作用^[6]. 若要探索含 N 污染物在生态修复中的去除机制, 就有必要进一步研究不同植物根际环境中与 N 循环有关的特定微生物的群落结构特征及植物对微生物群

落潜在的影响.

氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)可以将氨氧化为亚硝酸. 该反应是硝化过程的第一步, 同时也是限速步骤. 通过硝化及反硝化细菌的联合作用可以将 NH_4^+ 最终还原为气态的 N_2O 和 N_2 , 释放到大气中, 从而减轻了污染水体的 N 负荷^[7]. 传统的分离纯化方法仅能提供极少数硝化和反硝化细菌的生理、生化及分子调控机制, 而且那些通过分

收稿日期: 2007-08-29; 修订日期: 2007-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(40671068); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2002CB412300); 中国科学院百人计划项目; 中国科学院南京地理与湖泊研究所所长基金项目

作者简介: 邢鹏(1979~), 女, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为水生微生物生态, E-mail: pxing@niglas.ac.cn

* 通讯联系人, E-mail: fkgong@niglas.ac.cn

离培养获得并进行过深入研究的种类,其在自然环境中的作用未必是最重要的.目前,分子生物学技术已经大量引入对未知 AOB 的研究.水体及底泥中 AOB 的群落结构是目前 N 循环研究的热点之一,然而对水生植物根际 AOB 组成及多样性的研究尚未见报道.本研究通过比较不同水生植物根际 AOB 种类的差异,探讨植物对其根际细菌的选择性,以期为深入分析水生植被恢复对水质的净化作用机制打好基础.

1 材料与方法

1.1 样品的采集及预处理

在五里湖的生态修复区(图 1),采集芦苇(*Phragmites communis*) (1号点)、窄叶香蒲(*Typha angustifolia* L.) (2号点)、菹草(*Potamogeton crispus* L.) (3号点)、荇菜(*Limnathemum nymphaoides*) (4号点)的根系以及无高等水生植物区域的表层底泥(对照点).采样时间 2006-05-20.去除植物根系上的动植物残骸及石块等非底质杂物,收集附着在根系上的底泥作为样本.每个点设 3 个平行.采样同时迅速测定样本 pH 和氧化还原电位(oxidation-reduction potential, ORP).样品保存在便携式冷箱中运回实验室.样品的处理分 3 个部分:一部分用于细菌 DNA 提取的样品置于 -20°C 保存;一部分经风干、磨细、过筛、混匀、装瓶,作为风干样品;还有一部分用作新鲜样品, 4°C 黑暗保存,尽快分析.

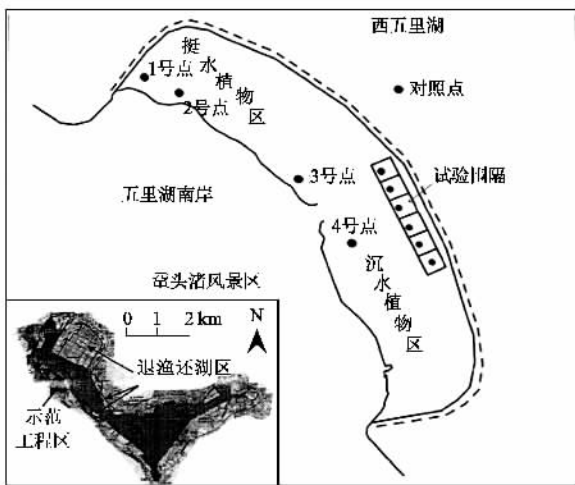


图 1 围隔示范工程及采样点位置

Fig.1 Demonstration engineering of the enclosure and location of the sampling sites

1.2 根际底泥理化性质分析^[8]

①将风干样品于 $105 \sim 110^{\circ}\text{C}$ 烘至恒重,计算底

泥含水率.②底泥全氮(TN)用半微量凯氏法测定;氨态氮($\text{NH}_4^+ -\text{N}$)用氯化钾提取,纳氏试剂比色法测定;硝态氮($\text{NO}_3^- -\text{N}$)用硫酸铜提取,酚二磺酸比色法测定.

1.3 最大可能数(most probable number, MPN)法计数 AOB

根据对不同样品中 AOB 浓度的预实验,确定适合各样品的菌液稀释度,保证最低稀释度的所有重复都应有菌生长,而最高稀释度的所有重复无菌生长.每个接种稀释度设 3~4 个重复.液体培养基成分为:(NH_4)₂SO₄ 0.5 g/L、NaCl 0.3 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.03 g/L、K₂HPO₄ 1 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.3 g/L和 CaCO₃ 7.5 g/L, pH 7.8. 25°C 恒温培养 14 d.用 Griess 试剂检测 NO₂⁻ 的存在,查 MPN 数量指标换算表,并采用下式计算样品中 AOB 的数量.不同的重复次数应按其相应的最大或然数表计算结果^[9].

$$\text{活菌数(每 g 干土)} = \frac{\text{菌数近似值} \times \text{数量指标第 1 位的稀释度}}{\text{土样中干土所占的质量分数}} \quad (1)$$

1.4 氨氧化细菌的 PCR-DGGE 分析

细菌基因组 DNA 的提取及纯化方法参考文献[10].巢式 PCR(nested PCR)扩增 AOB 的 16S rDNA 片段的步骤如图 2 所示.采用的引物序列中(表 1), F27/R1492 为针对细菌的通用引物,其能将细菌同其他生物区分开来^[11]; CTO189F/CTO654R 为针对 AOB 的特异性引物^[12,13]; F341/R518 为针对细菌 16S rDNA 的 V3 区特异引物,该区高度可变,常被用于细菌分类的研究^[14].40 个碱基的 GC 夹加在 F341 的 5'端,用于 DGGE 分析.各引物 PCR 反应条件见表 2.

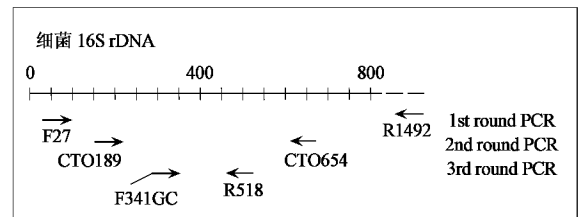


图 2 巢式 PCR 扩增 AOB 示意

Fig.2 Schematic representation of primer positions and nested PCR procedure for AOB specific amplification

采用美国 CBS 公司电泳仪(DGGE-2001)进行变性梯度凝胶电泳.使用梯度混合器制作浓度 8% 的聚丙烯酰胺变性胶^[14],变性剂梯度范围为 40%~70% [100% 变性剂含有 7 mol/L 尿素和 40% (体积

表 1 巢式 PCR 扩增氨氧化细菌所用引物

Table 1 Primer pairs for nested PCR of ammonia-oxidizing bacteria

引物名称	序列	特异性	文献
F27/R1492	F27-5'GTTTGATCCTGGCTCAG R1492-5'TACGGYTACCTTGTACGACTT	细菌	[11]
CTO189F/CTO654R	CTO189F-5'GGAGRAAAGYAGGGGATCG CTO654R-5'CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC	AOB	[12]
F341/R518	F341-5'CCTACGGGAGGCAGCAG R518-5'ATTACCGCGGCTGCTGG	细菌	[14]

表 2 巢式 PCR 扩增氨氧化细菌反应条件

Table 2 Nested PCR conditions for amplifying ammonia-oxidizing bacteria

引物名称	变性温度/℃	退火温度/℃	延伸温度/℃	循环数	文献
F27/R1492	94(时间 60 s)	50(时间 30 s)	72(时间 120 s)	30	[11]
CTO189F/CTO654R	94(时间 30 s)	55(时间 30 s)	72(时间 60 s)	30	[12]
F341/R518	94(时间 60 s)	55(时间 60 s)	72(时间 60 s)	30	[14]

比)去离子甲酰胺].电泳缓冲液为 $1 \times$ TAE (20 mmol/L Tris, 10 mmol/L acetate, 0.5 mmol/L EDTA, pH 8.0). 60 ℃ 恒压 100 V, 电泳 16 h. 电泳结束后, DGGE 胶用 SYBR Green I (1:10 000 稀释, Molecular Probe Inc.) 染色 15~30 min, Omega 10™ 全自动多功能凝胶成像分析系统拍照.

1.5 DGGE 条带的回收及序列测定

对 DGGE 胶片拍照后,用干净的手术刀小心将条带割下,放入预先灭菌的 1.5 mL eppendorf 管中. 每管加入 25 μ L 无菌水洗脱 DNA, 65℃ 温浴 30 min, 5 000 r/min 离心 1 min. 以 DNA 洗脱液为模板, 采用引物对 GC-341F/R518 重新扩增. 产物经 1.5% 琼脂糖验证后, 再次 DGGE, 确定回收片段的电泳位置与割胶前是否一致. 对不一致或存在杂带的片段重复这一过程 2~3 次, 直到无其他杂带存在^[13]. 采用 ABI 3700 测序仪测定 DNA 片段的碱基组成(委托上海基康生物技术公司).

1.6 系统发育分析

获得的序列均经过 Ribosomal Database Project II (RDP) 中的 CHECK_CHIMERA 软件检验^[15]. 在 GenBank 数据库中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行相似性比较, 获取同源性较高的相关 16S rDNA 序列.

1.7 统计分析

采用聚类的方法分析样品 DGGE 图谱的相似性. Sorensen's 系数的计算方法为 $S_D = (2n_{AB}) / (n_A + n_B)$, 式中 n_A 表示样品 A 的条带数, n_B 表示样品 B 的条带数, n_{AB} 则表示样品 A 和 B 共有的条带数. 根据计算得到的相似性指数, 采用非加权配对平均

数法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 对样品进行聚类, 采用的软件为 MVSP version 3.0 (Kovach Computing Services, UK), 聚类分析的结果采用树型图表示.

2 结果与分析

2.1 水生植物生长状况及底泥营养盐浓度

本研究通过对水生植物单位面积上的生物量估计其地下部分的现存量. 芦苇 (*Phragmites communis*) 和窄叶香蒲 (*Typha angustifolia*) 均为多年生挺水植物, 地上部分的生物量较高, 分别达到 1 000 g/m² 和 800 g/m². 菹草 (*Potamogeton crispus* L.) 为多年生沉水植物, 其地上部分的生物量也较大, 约 450 g/m² 左右. 荇菜 (*Limnathemum nymphoides*) 地上部分的生物量约 100 g/m² 左右 (表 3). 水生植物根际 ORP > 0, 即呈氧化环境, 同时芦苇和窄叶香蒲根际 ORP 要高于菹草和荇菜. 无草着生的底泥表层 (1~5 cm) 呈现弱还原条件, 表层之下 (6~10 cm) 还原性增强. 根际及无草着生的底泥表层的 pH 值均 > 7, 且表层底泥碱性更强. 表层底泥中 NH₄⁺-N 的浓度大于水生植物根际, 而各样品之间 NO₃⁻-N 含量差异不显著.

2.2 水生植物根际 MPN 法计数氨氧化细菌的结果

综合各样品氨氧化细菌数量的预实验结果, MPN 计数法选取的样品稀释度为 10⁻²~10⁻⁶. 水生植物根际 AOB 的密度高于无水生植物的表层底泥 (表 3). 挺水植物芦苇和窄叶香蒲根际 AOB 的密度又高于沉水植物菹草和浮叶植物荇菜. 芦苇和香蒲根际的 AOB 的数量比无水生植物的表层底泥高 1~2 个数量级.

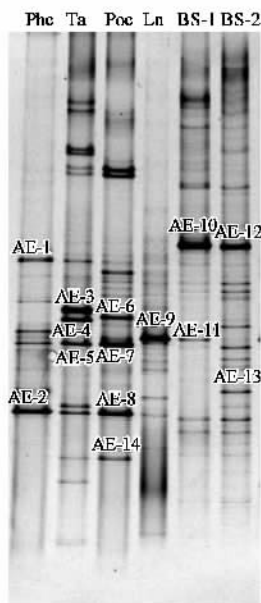
2.3 氨氧化细菌的 PCR-DGGE 及 DGGE 条带测序

表 3 采样点根际环境参数以及 MPN 法氨氧化细菌计数结果

Table 3 Descriptive parameters of sampling sites and MPN amount of AOB in sediment samples

样品名称	采样点	植物类型	水生植物现存量 /g·m ⁻²	氧化还原电位 /mV	pH	NH ₄ ⁺ -N /mg·kg ⁻¹	NO ₃ ⁻ -N /mg·kg ⁻¹	AOB 菌 计数(干底泥) /cells·g ⁻¹
Phc	芦苇根际	挺水植物	1 000	118 ± 10	7.46	2.68 ± 0.13	3.78 ± 0.30	2.8 × 10 ⁵
Ta	窄叶香蒲根际	挺水植物	800	150 ± 13	7.31	2.77 ± 0.19	4.26 ± 0.24	4.3 × 10 ⁵
Poc	菹草根际	沉水植物	450	77 ± 5	7.57	3.43 ± 0.18	3.03 ± 0.28	9.3 × 10 ⁴
Ln	荇菜根际	浮叶植物	100	68 ± 6	7.73	4.11 ± 0.22	2.95 ± 0.11	7.7 × 10 ⁴
BS-1	无草底泥(1~5 cm)	—	0	-45 ± 8	7.90	5.67 ± 0.31	2.57 ± 0.26	2.1 × 10 ⁴
BS-2	无草底泥(6~10 cm)	—	0	-133 ± 10	7.95	8.04 ± 0.38	3.03 ± 0.19	3.5 × 10 ⁴

采用巢式 PCR 的方法扩增 AOB, PCR 产物经纯化后 DGGE 结果如图 3 所示. 对其中相对含量 > 10%, 且电泳位置存在一定区别的条带进行割胶回收(如图 3). 6 个样品共回收 14 个条带. 测序后, 在 GenBank 中查找相似序列, 结果见表 4. 获得的序列与 GenBank 中已知序列的相似度都高于 97%. 14 个序列中, 除 AE-13 与 AE-14 外, 均与 Genbank 中已有的 AOB 序列相似; 尽管与各序列相似度最高的已知序列各不相同, 但都属于亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*). AE-13 与草酸杆菌属 (*Oxalobacter*) 的 AY367029 相似度较高, 而 AE-14 与未培养的 β 变性菌 AF141482 相似度达到 99%. 此外, 与 AE-1、AE-9/11、AE-10/12 相似度最高的序列均为未获得培养的 *Nitrosomonas*. 位置相同的条带 AE-2 与 AE-8, AE-9 与 AE-11 碱基组成完全相同; 而位置不同的条带, 如 AE-2 与 AE-5 碱基序列组成存在差异. 尽管



Phc: 芦苇; Ta: 窄叶香蒲; Poc: 菹草; Ln: 荇菜;
BS-1: 无草表层底泥(1~5cm); BS-2: 无草表层底泥(6~10 cm)

图 3 DGGE 分析 AOB 巢式 PCR 产物

Fig. 3 DGGE analysis of nested PCR products of AOB

AE-10 与 AE-12 均与同一序列相似度高, 均为 98%, 但 2 个序列的碱基组成存在差异. 相同情况也出现在 AE-5 与 AE-7 之间.

2.4 不同水生植物根际氨氧化细菌群落组成的比较

对 DGGE 图谱的聚类分析(UPGMA)分析显示(图 4), 无草区表层底泥(BS-1)同表层以下(BS-2)的相似度最高, 首先聚为一类; 其次, 与荇菜和菹草相似度较高, 而与芦苇和窄叶香蒲的相似度较低. 不同样品中主要的 AOB 种类(条带相对含量 > 10%) 存在一定的共同性. 如芦苇根际(Phc)的 AE-2 同荇菜(Poc)根际的 AE-8 序列相似度 > 99%; 窄叶香蒲(Ta)根际的 AE-5 同菹草(Ln)根际的 AE-7 序列相似度 > 99%; 荇菜根际的 AE-9 同无草表层底泥(BS-1) AE-10 序列相似度 > 99%; 无草表层底泥(BS-1) AE-11 同表层以下(BS-2)的 AE-12 序列相似度 > 99%. 同时, 不同样品之间 AOB 电泳模式也存在差异, 如 AE-3、AE-4 和 AE-6 位置极为相近, 但其序列相似度不高.

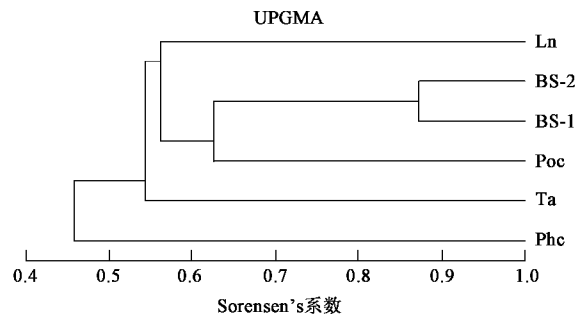


图 4 UPGMA 分析 AOB 群落组成及其相似性

Fig. 4 UPGMA description clustering of DGGE banding profiles in each lane

3 讨论

3.1 针对 AOB 引物的特异性

巢式 PCR 的方法通常用于扩增环境中拷贝数低或含有 PCR 抑制物的模板, 可以获得高质量的扩

表4 在 GenBank 数据库中搜索到的与 DGGE 回收条带序列最相近的 16S rRNA 基因序列

Table 4 Closest matches between 16S rRNA gene sequences of bands excised from sample-derived denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles and sequences from the GenBank databases obtained

条带编号	相似碱基数/序列长度 (相似度)	GenBank 中最相近序列 (NCBI 检索号)	文献
AE-1	174/177 (98%)	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone CLI-1/E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (DQ068702)	[16]
AE-2/8	175/177 (98%)	<i>Nitrosomonas cryotolerans</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AF272423)	[17]
AE-3	177/177 (100%)	<i>Nitrosomonas</i> sp. Is79A3 16S rRNA gene, isolate Is79A3 (DQ068705)	[16]
AE-4	173/177 (97%)	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm51 partial 16S rRNA gene, isolate Nm51 (AJ298737)	[18]
AE-5/7	174/177 (98%)	<i>Nitrosomonas</i> sp. R7c140 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AF386753)	[19]
AE-6	177/177 (100%)	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm51 partial 16S rRNA gene, isolate Nm51 (AJ298737)	[18]
AE-9/11	177/177 (100%)	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium clone LD1-B6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AY114347)	[20]
AE-10/12	175/177 (98%)	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp. isolate DGGE band L1 16S ribosomal RNA (DQ887679)	[21]
AE-13	174/177 (97%)	<i>Oxalobacter</i> sp. Es2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AY367029)	[22]
AE-14	176/177 (99%)	Uncultured beta Proteobacterium clone CRE-FL68 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AF141482)	[23]

增产物用于群落组成指纹分析以及序列测定^[24]。由于 AOB 在某些环境条件下不占优势,普通的 PCR 可能检测不到,因此本研究也引入巢式 PCR 方法。Mahmood 等^[13]通过对不同引物组合巢式扩增 AOB 结果的比较,发现 27F/1492R-CTO189F/CTO654R-GC341F/518R 引物组合获得的 AOB 序列较多,且后续的 DGGE 分辨率较高。而其他组合,如使用针对 β -氨单加氧酶 (β -ammonium monooxygenase, β AMO) 基因的引物,可能会在扩增 AOB 的同时获得在土壤中数量众多的多噬菌属 (*Variovorax*) 细菌的序列,引物的特异性不高。不过在本研究中,即使使用 Mahmood 等^[13]推荐的引物组合获得的序列中,仍获得了不属于 AOB 的序列,因此采用 CTO189F/CTO654R 引物区分环境样品中的 AOB 仍存在局限。

3.2 水生植物对其根际细菌群落组成的影响

如前所述,在湿地及其他生态系统中,植物本身对 N 元素的直接去除作用很小,但植物是整个系统中必不可少的一部分,它们可以从各种途径影响含 N 化合物的微生物转化:①微生物的生长离不开各种营养物质,根系的分泌物为微生物的生长提供碳源^[25,26];②植物对水分的吸收改变底泥通风状态,从而影响气体和溶解态营养物质的扩散^[27];③植物能够从大气中输送不同的气体(氧气、气态氮)到底泥,反之亦然^[28],促进氮循环过程的完成。此外,植物与微生物竞争硝酸氮^[29,30],也能起到一定的氮去除的作用,尽管比例不高。

本研究获得的 AOB 序列均属于氨氧化细菌的亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*),这与其他研究的结果具有一定的共同性。Speksnijder 等^[31]的研究发现在淡水水域底泥中常见的 AOB 种类主要为

Nitrosomonas-like。另外, Freitag 等^[16]跟踪了从河流入海口到开阔海域中的 AOB 种类的变化,发现存在由亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 向亚硝化螺菌属 (*Nitrosopira*) 演化的趋势。可见不同的 AOB 种类所适合的生态位存在明显差异。

MPN 计数的结果显示,水生植物根际 AOB 的数量高于对照区,同时芦苇和窄叶香蒲根际的氨氧化细菌密度又高于菹草和荇菜。不同植物的根系发达程度不同,因此对根际环境所产生的影响存在差异。Seidel 等^[32]研究发现芦苇是一种良好的净水植物,具有发达的根系,芦苇体内具有中空的通气组织,根部生长着大量很细的根毛,叶片吸收的氧气可以通过茎和根状茎的通气组织到达根毛,并从根毛分泌出来,形成一个厚度 < 1 mm 充满氧气的围绕着根毛的液体薄膜,在芦苇根际形成特殊的生态条件。这种根际可以供养大量的需氧微生物群落,且使其生物活性增强,加速有机物的分解^[33]。

4 结论

(1) 水生植物根际微环境对 AOB 具有一定的富集作用。

(2) 植物根际的氧化环境有利于促进氨氧化作用的发生,加速 NH_4^+ 的转化。

(3) 4 种植物根际亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas*) 为氨氧化细菌主要的优势种,同时不同植物根际 AOB 主要种类存在差异。

(4) 水生植物根际对 AOB 的富集及种群组成调控机制,对生态修复过程中营养盐循环具有重要作用。

参考文献:

[1] 李睿华,管运涛,何苗,等. 河岸混合植物带处理受污染河

- 水中试研究[J]. 环境科学, 2006, 27(4): 651-654.
- [2] Reilly J F. Nitrate removal from a drinking water supply with large free-surface constructed wetlands prior to groundwater recharge [J]. Ecol Eng, 2000, 14: 33-47.
- [3] Stottmeister U, Wießner A, Kuschk P, *et al.* Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment [J]. Biotechnol Adv, 2003, 22(1-2): 93-117.
- [4] Elliott L F, Gilmour C M, Lynch J M, *et al.* Bacterial colonization of plant roots [A]. In: Todd R L, Giddens J E (eds). Microbial-Plant Interactions [M]. Madison: Soil Science Society of America, 1984. 1-16.
- [5] Brix H. Wastewater treatment in constructed wetlands: system design, removal processes, and treatment performance [A]. In: Moshiri G A (ed). Constructed Wetlands for Water Quality Improvement [M]. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1993. 9-22.
- [6] Kemp W M, Sampou P, Cairey J, *et al.* Ammonium recycling versus denitrification in Chesapeake Bay sediments [J]. Limnol Oceanogr, 1990, 35(7): 1545-1563.
- [7] Bothe H, Jost G, Schloter M, *et al.* Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments [J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(5): 673-690.
- [8] 金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范[M]. (第二版). 北京: 中国环境科学出版社, 1990. 239-245.
- [9] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [10] Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, *et al.* Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(11): 4715-4724.
- [11] Lane D J. 16S/23S rRNA sequencing [A]. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds). Nucleic acid techniques in bacterial systematics [M]. Chichester: Academic Press, 1991. 115-175.
- [12] Kowalchuk G A, Stephen J R, DeBoer W, *et al.* Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(4): 1489-1497.
- [13] Mahmood S, Freitag T E, Prosser J I. Comparison of PCR primer-based strategies for characterization of ammonia oxidizer communities in environmental samples [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2006, 56(3): 482-493.
- [14] Muyzer G, Dewaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S ribosomal RNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695-700.
- [15] Maidak B L, Cole J R, Lilburn T G, *et al.* The RDP (Ribosomal Database Project) continues [J]. Nuclei Acids Res, 2000, 28: 173-174.
- [16] Freitag T E, Chang L, Prosser J I. Changes in the community structure and activity of betaproteobacterial ammonia-oxidizing sediment bacteria along a freshwater-marine gradient [J]. Environ Microbiol, 2006, 8(4): 684-696.
- [17] Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, *et al.* Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(12): 5368-5382.
- [18] Aakra Å, Utåker J B, Pommerening-Röser A, *et al.* Detailed phylogeny of ammonia-oxidizing bacteria determined by rDNA sequences and DNA homology values [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51: 2021-2030.
- [19] Burrell P C, Phalen C M, Hovanec T A. Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(12): 5791-5800.
- [20] Freitag T E, Prosser J I. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(3): 1359-1371.
- [21] Sundberg C, Stendahl J S K, Tonderski K, *et al.* Overland flow systems for treatment of landfill leachates-potential nitrification and structure of the ammonia-oxidizing bacterial community during a growing season [J]. Soil Biol Biochem, 2007, 39(1): 127-138.
- [22] Vacca D J, Bleam W F, Hickey W J. Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(7): 3797-3805.
- [23] Crump B C, Armbrust E V, Baross J A. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(7): 3192-3204.
- [24] Dar S A, Kuenen J G, Muyzer G. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determined the diversity of sulfate reducing bacteria in complex microbial communities [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(5): 2325-2330.
- [25] Karjalainen H, Stefansson G, Tuominen L, *et al.* Do submersed plants enhance microbial activity in sediment? [J]. Aquat Bot, 2001, 69(1): 1-13.
- [26] Richert M, Saamio S, Jutinen S, *et al.* Distribution of assimilated carbon in the system *Phragmites australis* waterlogged peat soil after carbon-14 pulse labeling [J]. Biology and Fertility of Soils, 2000, 32(1): 1-7.
- [27] Granli T, Boeckman O C. Nitrous oxide from agriculture [J]. Norwegian J of Agricultural Sci, 1994, 12: 1-128.
- [28] Arth I, Frenzel P, Conrad R. Denitrification coupled to nitrification in the rhizosphere of rice [J]. Soil Biol Biochem, 1998, 30(4): 509-515.
- [29] Kaye J P, Hart S C. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms [J]. Trends Ecol Evol, 1997, 12(4): 139-143.
- [30] Wang J, Bakken L. Competition for nitrogen during decomposition of plant residues in soil: Effect of spatial placement of N-rich and N-poor plant residues [J]. Soil Biol Biochem, 1997, 29(2): 153-162.
- [31] Speksnijder A G, Kowalchuk G A, Roest K, *et al.* Recovery of a *Nitrosomonas*-like 16S rDNA sequence group freshwater habitats [J]. Syst Appl Microbiol, 1998, 21(2): 321-330.
- [32] Seidel K. Macrophytes and water purification biological control of water pollution [M]. Philadelphia: Pennsylvania University Press, 1976.
- [33] Reddy K R, D' Angelo E M. Biogeochemical indicators to evaluate pollutant removal efficiency in constructed Wetlands [J]. Water Sci Technol, 1997, 35(5): 1-10.